

Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București



TEZA DE DOCTORAT
APLICAȚII ALE OZONULUI ÎN SĂNĂTATE ȘI MEDIU

Conducător științific: Prof. Dr. Ioana LĂCĂTUȘU

Doctorand: Maria (TIRON) MARCVART

2024

Cuprins

INTRODUCERE.....	1
Justificarea alegerii temei.....	1
Obiective principale.....	2
I. STUDIUL DOCUMENTAR – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND APLICAȚIILE OZONULUI ÎN SĂNĂTATE ȘI MEDIU	
1. ASPECTE ALE CHIMIEI OZONULUI.....	4
1.1 Localizare în natură.....	4
1.2 Structura moleculară a ozonului.....	7
1.2.1 Scurt istoric al descoperirii, cercetării și utilizării ozonului.....	7
1.2.2 Structura moleculei de ozon.....	8
1.3 Proprietăți fizico-chimice ale ozonului. Comportamentul ozonului în soluții apoase.....	10
1.4 Toxicitatea ozonului.....	17
1.5 Generarea ozonului.....	21
2. Aplicații ale ozonului în sănătate.....	23
2.1 Evoluția ozonoterapiei în lume. Stadiul actual al ozonoterapiei în România.....	23
2.2 Homeostazia redox.....	24
2.2.1 Stresul oxidativ.....	25
2.2.2 Specii reactive și apărare antioxidantă.....	26
2.2.3 Efectul redox global și răspunsul celular la stres.....	30
2.3 Acțiunea ozonului medical în sistemul biologic.....	32
2.3.1 Concepte moderne în ozonoterapie.....	33
2.3.2 Acțiuni ale ozonului medical în organism.....	34
2.4 Aplicații clinice ale ozonului medical.....	39
2.4.1 Studii de ozonoterapie în literatura de specialitate.....	39
2.4.2 Tehnici de aplicare a ozonului medical.....	45
3. Aplicații ale ozonului în mediu.....	47
3.1. Aplicații industriale.....	47
3.2. Aplicații ale ozonului în depoluarea mediilor apoase.....	48

Concluzii la studiul documentar.....	53
II. CONTRIBUȚII LA APLICAȚII ALE OZONULUI ÎN SĂNĂTATE ȘI MEDIU.....	54
4. Aplicații ale ozonului medical în diabetul zaharat complicat cu neuropatie diabetică	
4.1 Ipoteza de lucru și obiectivul specific al studiului.....	54
4.2 Pacienți și metode.....	58
4.2.1 Selecția pacienților.....	58
4.2.2 Evaluarea pacienților.....	59
4.2.3 Tratatamentul pacienților.....	62
4.3 Rezultate.....	66
4.4 Discuții.....	83
Concluzii parțiale ale studiului.....	89
5. Aplicații ale ozonului medical în nevralgia de trigemen.	
Mecanisme neurofiziopatologice și rezultate.....	90
5.1. Ipoteza de lucru și obiectivul specific al studiului.....	90
5.2. Pacienți și metode.....	93
5.2.1 Selecția pacienților.....	93
5.2.2 Evaluarea pacienților.....	94
5.2.3 Tratatamentul pacienților.....	95
5.3. Rezultate.....	96
5.4. Discuții.....	110
Concluzii parțiale ale studiului.....	119
6. Cercetări privind decolorarea prin ozonizare a mediilor apoase.....	120
6.1. Oportunitatea cercetării.....	120
6.2 Selecția colorantului BB FCF.....	120
6.3 Date preliminare privind comportamentul ozonului în soluții apoase.....	125
6.3.1. Stabilitatea ozonului în apă. Speciații.....	125
6.3.2. Decolorarea prin ozonizare fără modificare de pH a soluției de colorant BB FCF.....	125
6.4. Influența pH-ului asupra procesului de decolorare.....	130
6.4.1. Decolorarea prin ozonizare la pH acid.....	131

6.4.2 Decolorarea prin ozonizare la pH neutru.....	132
6.4.3. Decolorarea prin ozonizare la pH alcalin.....	134
6.4.4 Reproductibilitatea decolorării.....	135
6.5. Aspecte ale cineticii procesului de decolorare a soluției de colorant BB FCF cu ozon.....	137
6.5.1. Cercetări preliminare.....	139
6.5.2. Spectroscopie ¹ H-NMR.....	144
6.5.3. Modelare cinetică.....	147
6.6. Toxicitatea colorantului BB FCF și ai produșilor de oxidare.....	155
7. Concluzii.....	163

Bibliografie

Lista lucrărilor științifice publicate

Lista abrevierilor și simbolurilor

Anexe

APLICATII ALE OZONULUI IN SANATATE SI MEDIU

Rezumat

Introducere

Elaborarea acestei teze de doctorat s-a realizat din dorința de cercetare și aprofundare a acțiunii ozonului în sistemul biologic, pe de o parte cunoscând puternica sa capacitate de oxidare și efectul potențial toxic asupra organismului uman, dar pe de altă parte având rezultate clinice remarcabile în practica ozonoterapiei. În cei 180 de ani de la descoperirea ozonului s-au derulat numeroase cercetări descoperindu-i-se formula moleculară, structura, proprietățile fizice, chimice, rolul și aplicațiile în diverse domenii. Potențialul puternic oxidativ al ozonului stă la baza tuturor aplicațiilor și utilizărilor sale, fiind însă și motivul de îngrijorare privind toxicitatea sa potențială. Aceste aspecte au fost considerate insuficient studiate, de aici scepticismul legat de beneficiul și mai ales de riscurile aplicării ozonului în medicină.

A doua direcție de cercetare abordată în teză este legată de utilizarea ozonului în protecția mediului, respectiv în îndepărtarea coloranților sintetici din apele uzate industriale sau urbane, utilizarea industrială crescândă a acestor compuși conducând la acumularea lor în diferite sisteme apoase reale (rețeaua de canalizare, ape de suprafață etc) – cu potențial toxic semnificativ asupra organismelor acvaticе. În aceste condiții posibilitatea utilizării ozonului a luat amploare. De altfel în ultimele decenii majoritatea stațiilor de epurare folosește ozonul în cel puțin una din etapele de prelucrare.

Obiective principale - În acest context, prezenta teză de doctorat abordează două tematici distincte (medicină și protecția mediului înconjurător) de actualitate și noutate, atât la nivel național cât și mondial, cu perspective de cercetări noi pentru menținerea și creșterea calității vieții. Obiectivele principale ale părții originale sunt:

- **Ozonul în medicină** - Evidențierea eficienței și siguranței tratamentului medical cu ozon în patologii grave, potențial invalidante: neuropatia diabetică și nevralgia de trigemen. Pentru realizarea acestui obiectiv s-au studiat două loturi de pacienți tratați cu ozon medical în perioada 2015-2020, prezentând aceste afecțiuni, care au ca mecanisme etiopatogenice stresul oxidativ cronic, inflamația cronică, tulburări ale nocicepției etc. Pe baza cunoașterii comportării chimice a ozonului, a interacțiunilor sale cu sistemul biologic, un obiectiv important a fost înțelegerea / explicarea mecanismelor de acțiune a acestuia în organismul uman în patologia cercetată.
- **Ozonul în protecția mediului înconjurător** – Studierea aplicabilității procesului de ozonizare la decolorarea unor coloranți refractari la metode de tratare convenționale. A fost selectat Albastru Brilliant (BB), un colorant sintetic folosit uzual în industria farmaceutică, alimentară, textilă, cosmetică, și chiar în medicină.

A fost efectuat studiul factorilor de influență: pH, concentrația inițială a colorantului și a ozonului aplicat, timpul de contact, raportul molar [O₃:BB], timpul de agitare, în vederea stabilirii parametrilor optimi de decolorare pentru obținerea unui efluent nepericulos. Eliminarea culorii prin ozonizare nu conduce la o mineralizare completă a colorantului, iar produșii intermediari formați pot avea o toxicitate mai mare decât a colorantului inițial, ceea ce a condus la stabilirea altor două obiective:

- Identificarea produșilor intermediari de oxidare, obținuți la degradarea BB prin ozonizare, în condițiile date, prin spectroscopie ¹H – NMR;
- Studierea comparativă a ecotoxicității soluțiilor de colorant BB înainte și după ozonizare prin urmărirea efectelor asupra unor organisme acvaticе (crustacee planctonice, micro - alge verzi și pești de apă dulce);

- Abordarea dinamicii procesului - verificarea modelelor cinetice clasice, de ordin 1 și 2, prin metoda integrală, și a celor de pseudo ordin 1 și 2 nu a condus la rezultate interpretabile. Necunoscându-se stoichiometria reacțiilor în timpul ozonizării și dependența de factorii menționați anterior, dar coroborând informațiile oferite de analiza spectrului de masă a colorantului, de studiul toxicității produșilor și de succesiunea de reacții posibile și a multiplelor posibilități de scindare a colorantului, a fost propus un model cinetic complex pentru decolorarea cu O₃ a soluțiilor de BB.

Rezultatele obținute în cercetarea efectuată constituie baza științifică pentru evaluarea fezabilității tehnice, economice și în ceea ce privește protecția mediului, a avantajelor și dezavantajelor utilizării ozonului în îndepărtarea acestui colorant.

Studierea în paralel a comportamentului chimic al ozonului în soluții apoase și acțiunea sa în sistemele biologice reprezintă contribuția originală. De asemenea s-au adus contribuții importante în tematicile de cercetare abordate prin obținerea unor informații noi cu privire la ecotoxicitatea colorantului BB și o primă încercare de a realiza o modelare a procesului de decolorare a BB prin ozonizare luând în considerare atât transferul de masă cât și sistemul de reacții succesive, în lanț.

Prin obiectivele asumate, teza de doctorat se înscrie în problematica actuală a celor două domenii abordate:

1. Ozonul aplicat în medicină ca tratament complementar sigur și eficient în multiple patologii - cunoaște o dezvoltare semnificativă în ultimii ani, dar necesită explicarea pe baze științifice a mecanismelor de acțiune, a beneficiilor și a limitelor aplicării, având în vedere toxicitatea sa.
2. Ozonul ca oxidant aplicat în protecția mediului înconjurător, respectiv în îndepărtarea unor poluanți chimici și biologici (coloranți, aditivi, medicamente, microorganisme) - permite extinderea ariei sale de aplicabilitate, cu condiția evidențierii aspectelor de eficiență și limitare a proceselor.

Prezenta lucrare de doctorat a fost structurată în două părți și cuprinde șapte capitole reprezentative pentru subiectele abordate: **Partea I-a** – Studiu bibliografic (3 capitole) și **Partea a II-a** – Contribuții proprii (4 capitole). Teza are un număr total de 169 pagini redactate la 1,15 rânduri, din care 53 de pagini Partea I și 116 de pagini Partea a II-a. Teza cuprinde 75 tabele, 61 figuri/scheme. La sfârșitul lucrării sunt prezentate 308 referințe bibliografice (din care 183 din 2014-2024) în ordinea citării lor în text, precum și lucrările publicate pe parcursul elaborării tezei.

Prima parte a tezei (capitolele 1-3) prezintă date de literatură privitoare la stadiul actual al cunoașterii în domeniul aplicațiilor ozonului în sănătate și mediu. Studiul bibliografic a fost axat pe informațiile din literatură referitoare la chimia ozonului, la acțiunea acestuia în sistemul biologic și în mediu. S-au avut în vedere aspecte privind corelația dintre structură, proprietăți și aplicații ale ozonului în medicină și protecția mediului înconjurător.

Capitolul 1, intitulat “Aspecte ale chimiei ozonului”, cuprinde noțiuni referitoare la structura moleculei de ozon, proprietățile chimice și fizice ale ozonului, în special comportamentul ozonului în soluții apoase, precum și studii privind toxicitatea ozonului.

Capitolul 2, intitulat „Aplicații ale ozonului în sănătate”, cuprinde informații recente privind homeostazia redox, precum și aspecte caracteristice ale acțiunii ozonului în sistemul biologic, concepte moderne ale ozonoterapiei actuale și aplicații clinice ale ozonului medical.

Capitolul 3 intitulat „Aplicații ale ozonului în mediu” este dedicat aplicațiilor ozonului în protecția mediului și în industrie – prin intermediul reacțiilor directe și indirecte (datorită capacității O₃ de a induce reacții radicalice în lanț).

Partea a doua a tezei (capitolele 4-6) prezintă contribuțiile proprii la aplicații ale ozonului în medicină și protecția mediului înconjurător. **Capitolul 4**, intitulat “Aplicații ale

ozonoterapiei în diabetul zaharat complicat cu neuropatie diabetică” prezintă elaborarea și rezultatele unui studiu medical în cadrul căruia este evidențiată acțiunea ozonului medical în neuropatia diabetică - patologie gravă, potențial invalidantă. **Capitolul 5** intitulat “Aplicații ale ozonoterapiei în nevralgia de trigemen. Mecanisme neurofiziopatologice și rezultate” prezintă etapele și rezultatele cercetării efectului ozonoterapiei (O₃T) în tratarea unei afecțiuni dureroase debilitante – nevralgia trigeminală – dificil de tratat, ale cărei mecanisme etiopatogenice sunt încă parțial cunoscute. **Capitolul 6** intitulat “ Cercetări privind decolorarea prin ozonizare a mediilor apoase” este consacrat unor studii privind aplicabilitatea procesului de ozonizare la decolorarea colorantului Albastru Brilliant (BB FCF), refractar la metode convenționale de tratare. Au fost cercetați parametrii optimi pentru decolorarea prin ozonizare (cu accent pe influența pH-ului), cinetica reacțiilor care stau la baza decolorării BB FCF, identificarea produșilor de oxidare prin ozonizare, precum și studiul ecotoxicității soluțiilor de BB FCF pre- și post-ozonizare. **Capitolul 7** cuprinde concluziile generale ale lucrării și posibilitățile de dezvoltare ulterioară alături de contribuțiile proprii. Teza se încheie cu un capitol de Bibliografie conținând 308 referințe bibliografice și cu anexarea lucrărilor publicate.

Rezumatul de față cuprinde într-o formă concisă conținutul capitolelor 4 - 6, de contribuții proprii. Numerotarea capitolelor, subcapitolelor și a tabelor/figurilor corespunde cu cea din teză.

Capitolul 4. Aplicații ale ozonoterapiei în diabetul zaharat complicat cu neuropatie diabetică

Obiectivul specific al acestui studiu a fost de a evalua și cuantifica efectul O₃T, aplicată complementar unor pacienți (N=73) suferind de diabet zaharat (DZ) complicat cu neuropatie diabetică (ND), această patologie constituind o grava problemă de sanatate publică, prin creșterea alarmantă a numărului de cazuri, dezvoltarea complicațiilor cronice și prin agravarea co-morbidităților (cardiovasculare etc).

Selecția pacienților (incluere/excludere), **evaluarea clinică și biologică, monitorizarea evoluției sub tratament** au fost efectuate după criteriile stricte, în conformitate cu reglementările internaționale în domeniu [103,106,191,196,197,200-203]. Pacienții au efectuat investigații biologice specifice DZ, ND [203]. Pentru evaluarea clinică au fost utilizate: screening-ul ND și scorul dizabilității neuropate (dupa testul Michigan) [201,203], scala Dyck pentru aprecierea stadiului ND pre- și post- O₃T, scala numerică de evaluare a durerii (SNED) pentru cuantificarea durerii dar și aprecierea impactului suferinței neuropate asupra funcționalității și stării mentale/emoționale a pacienților (parametri ai calității vieții-QoL) [204]. Evaluarea sensibilității (epicritică-protopatică, termică, nociceptivă, proprioceptivă-vibratorie) fost efectuată cu ajutorul testelor semi-cantitative (sQST) [205-207].

Administrarea tratamentului - Pacienții au fost tratați cu ozon medical pe lângă tratamentul convențional al bolii de bază / co-morbidităților. Ozonul a fost obținut cu ajutorul unui generator Ozonosan Alpha Plus Photonik Boardcase (utilizând oxigen de puritate înaltă) propriu modalităților de aplicare generală și topica/locala a O₃T. Concentrațiile utilizate au variat între 5 și 35 mcg O₃/100 mL amestec, în funcție de calea de administrare. Dozele/concentrațiile de ozon aplicate au respectat regula “start low, go slow” - în intenția echilibrării statusului oxidativ și inducerii unei toleranțe la ozon [81,92,272]. Ozonul a fost produs și utilizat doar în momentul aplicării tratamentului, cu respectarea strictă a normelor privind siguranța pacientului, a utilizatorului și a mediului [29]. Au fost utilizate dispozitive și materiale consumabile, sterile, de unică folosință, majoritatea fiind din materiale ozonorezistente (sticla, silicon, polipropilena, oțel inoxidabil etc.).

Rezultatele pacienților cu DZ+ND tratați cu O₃ medical – după 5 săptămâni de O₃T a fost observată ameliorarea semnificativă a majorității criteriilor clinice și biologice urmărite.

Tabel 4.4 : Evoluția unor parametri clinici și biologici la pacienții cu DZ și ND după O₃T

Parametru	Evoluție		Diferența* (in %)	Valoarea p (t-Student test)
	Media variabilelor numerice*			
	Inainte de O ₃ T*	După O ₃ T*		
IMC (Kg/cm ²)	29,44	27,60	6,24	0,004
Glicemie a jeun (mg/dL)	174	153	12,07	0,069
HbA1c (%)	8,12	7,24	10,78	0,081
Colesterol total (mg/dL)	262,37	240,31	8,40	0,053
TGL (mg/dL)	188,51	174,82	9,38	0,041
Creatinină serică (mg/dL)	1,35	1,15	14,81	0,063
Acid uric seric (mg/dL)	7,17	6,54	8,76	0,038
CRP (mg/dL)	6,06	4,95	12,16	0,057
Fibrinogen (mg/dL)	407,28	369,76	9,21	0,092
GGT (U/L)	42,45	39,12	7,84	0,028

Obs.: *Variabile numerice cu distribuție gaussiană

Tabel 4.5: Evoluția suferinței neuropate și a unor parametri de calitate a vieții (QoL) la pacienții cu DZ și ND după O₃T

Parametru	Media variabilelor numerice*		Diferența* (in %)	Valoarea p (t-Student test)
	Inainte de O ₃ T	După O ₃ T		
Dureri neuropate (scara SNED)	2,16	1,06	50,63	0,028
Parestezii	2,05	0,97	52,67	0,014
Stare generală alterată	3	1,39	53,42	0,050
Tulb. motricitate/mobilitate	2,59	1,46	43,49	0,009
Scăderea funcț. Autonomie/autoîngrijire	1,03	0,38	62,65	0,027
Scăderea funcț. casnice/zilnice	1,97	1,07	45,84	0,016
Scăderea funcț. Sociale	2,52	1,28	48,91	0,031
Insomnii	1,93	1,04	46,10	0,042
Anxietate	2,16	1,12	48,10	0,038
Descurajare, tulb. Depresivă	2,14	1,01	52,55	0,017

Obs.: *Variabile numerice cu distribuție gaussiană

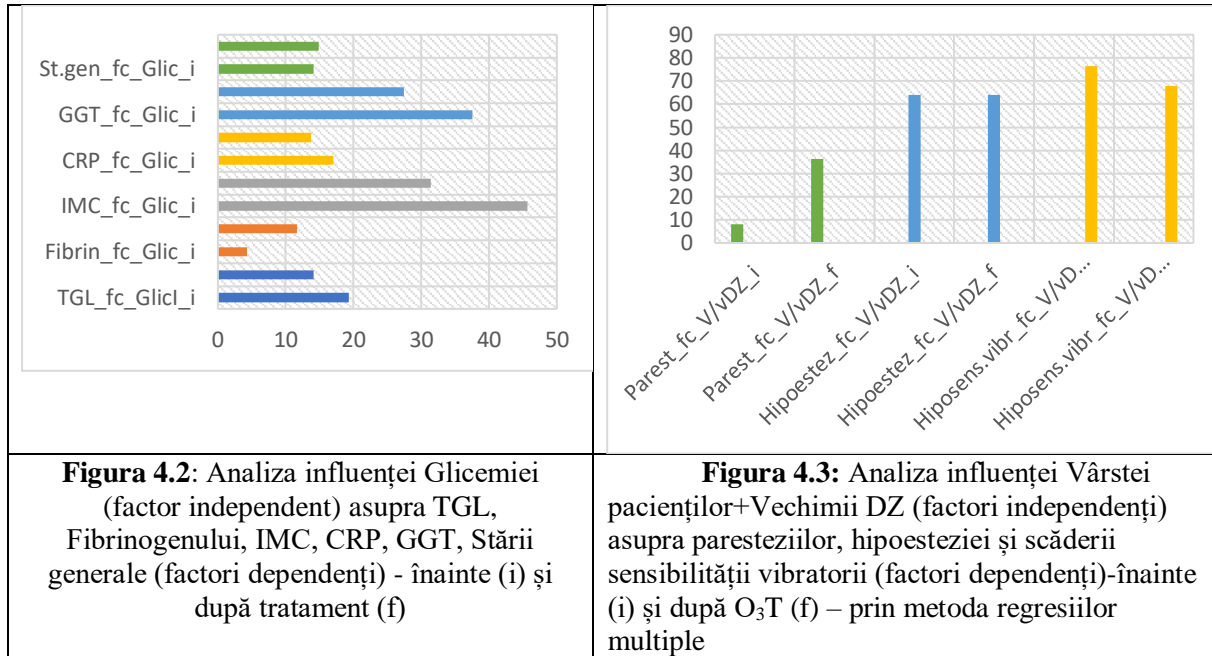
Tabel 4.6: Evoluția unor tulburări de sensibilitate la pacienții cu DZ și ND după O₃T

Parametru	Media variabilelor numerice*		Diferența* (in %)	Valoarea p (t-Student test)
	Inainte de O ₃ T	După O ₃ T		
Hipoestezie	0,93	0,60	35,18	0,038
Tulb. sensibilitate vibratorie	0,86	0,52	39,69	0,004
Tulb sensibilitate nociceptivă	0,55	0,28	47,51	0,039
Tulb sensibilitate termică	0,35	0,16	6,83	0,085

Prelucrarea statistica a datelor - Analiza privind factorii de influență a ținut cont de diferite variabile: vârsta pacientului, vechimea diabetului zaharat (DZ), indicele de masă corporală (IMC), valorile glicemiei, HbA1c, TGL, colesterolului total, CRP, fibrinogenului,

GGT, dar și de starea generală, afectarea motricității, afectarea funcționalității, prezența tulburărilor de sensibilitate etc. Baza de date a cuprins 73 de înregistrări (N=73), fiecare având 26 parametri de evaluare, estimați înainte și după O₃T (Anexa 6). Analiza varianței s-a efectuat cu ajutorul testului ANOVA.

Prelucrarea statistică - prin metoda regresiiilor multiple - a permis corelații complexe între parametrii biologici și cei clinici, între vârsta înaintată și evoluția prelungită a bolii, etc. Fig 4.2 și 4.3.



Concluziile studiului:

- A fost constatată legătura directă dintre aplicarea ozonului medical și ameliorarea complexă (biochimică, metabolică, a suferinței neuropate și a impactului acesteia asupra calității vieții) a pacienților selectați în studiu;
- A fost posibilă scăderea necesarului terapeutic – în acord cu medicul curant - prin efectele sinergice ale O₃ și ale tratamentului de bază și prin ameliorarea metabolizării mai active a tratamentului patogenetic +/- simptomatic, sub influența O₃T (efect detoxifiant);
- Scăderea morbidității cauzate de aceasta patologie, prin prevenția evoluției către piciorul diabetic și amputații etc; impact pozitiv asupra complicațiilor cardio-vasculare, renale, oftalmologice și a procesului de îmbătrânire;
- O₃T aplicată corect – diagnostic precis, doze/concentrații mici, proceduri standardizate și sigure – complementar cu tratamentul specific, cu respectarea dietei corecte și a stilului de viață sănătos, a acționat benefic asupra patologiei-țintă, îmbunătățind starea generală, corectând dezechilibre biologice, stimulând procesul de vindecare-cicatrizare, practic fără efecte adverse.

Elemente de originalitate a studiului:

- Modalitatea complexă de evaluare a pacienților înainte și după O₃T;
- Asocierea tipurilor de aplicație a ozonului medical: aplicații topice, locale și loco-regionale și CDL, combinate cu aplicațiile generale – care pare a fi cea mai eficientă strategie terapeutică, acționând sinergic și cumulează beneficiile efectelor locale și generale ale ozonului;

- Descrierea fenotipurilor senzoriale la pacienții studiului (Fig 4.4) – permite precizarea substratului anatomic al suferinței neuropate și explicarea variabilității răspunsului la tratament.

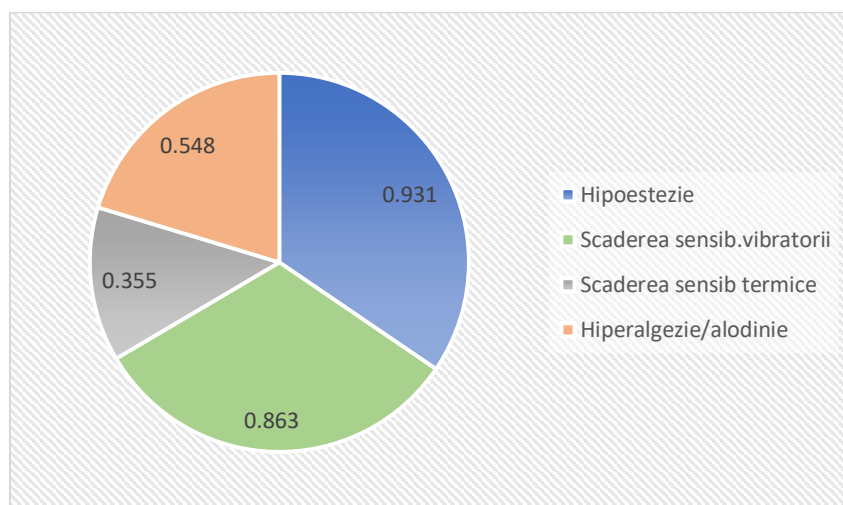


Figura 4.4: Tipologia senzorială a pacienților studiului

Limitele studiului:

- Absența unui lot de control;
- Insuficiența evaluării stresului oxidativ și apărării antioxidante.

Perspective de cercetare - Organizarea și desfășurarea unor studii multicentrice naționale/internaționale cu criterii și proceduri unitare, precum și studii controlate randomizate în această patologie.

Capitolul 5. Aplicații ale ozonoterapiei în nevralgia de trigemen.

Mecanisme neurofiziopatologice și rezultate

Obiectivul specific al studiului privind aplicarea O₃T în nevralgia de trigemen a fost de a evalua și cuantifica efectul ozonoterapiei (O₃T) asupra unui grup de pacienți suferind de nevralgie trigeminală (NT), o afecțiune dureroasă debilitantă, foarte dificil de tratat. Au fost selectați treizeci și trei de pacienți de ambele sexe, cu vârste cuprinse între 28- 83 de ani, prezentați la Centrul Medical Dr. Tiron între 2015 și 2020 cu TN primară. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Centrului Medical.

Diagnosticul și includerea în studiu s-au bazat pe criteriile ICHD-3 pentru TN [235].

Evaluarea pacienților – a fost realizată prin anamneză, examinare generală și locală, evaluarea tulburărilor de sensibilitate – în mod similar cu studiul anterior.

Aplicarea și monitorizarea tratamentului - pacienții au fost pe deplin informați cu privire la scopul/procedura tratamentului și toți au semnat un **consimțământ informat**. Pacienților li s-au aplicat 12 -15 ședințe de tratament cu o frecvență de 2-3 ședințe/săptămână.

Pacienții au fost considerați respondenți pe baza ameliorării/dispariției durerii, a satisfacției generale, a reluării activităților obișnuite etc. Au fost luate în considerare modificările cantitative și calitative ale durerii și ale simptomelor/semnelor asociate.

Rezultatele obținute au arătat că, în urma tratamentului, au existat îmbunătățiri semnificative ($P < 0.05$) privind: ameliorarea durerii (scăderea intensității durerii/frecvenței paroxismelor dureroase - PD, atenuarea/dispariția fondului dureros - FD); scăderea consumului de medicamente; ameliorarea stării generale, a tulburărilor de alimentație, de somn, a stării psihice/emoționale; reluarea activităților obișnuite (casnice, profesionale, sociale); ameliorarea/dispariția tulburărilor de sensibilitate - a existat o scădere semnificativă statistic a

hiperesteziei, hiperalgeziei mecanice și termice post -tratament, iar diferențele au fost semnificative.

Prin prelucrarea statistică efectuată studiul a permis corelații între vârsta înaintată și evoluția prelungită a bolii, afectarea calității vieții, prezența anxietății și depresiei, prezența insomniei, etc – Fig 5.17. Cu toate acestea, vârsta mai înaintată nu s-a corelat semnificativ cu intensitatea durerii.

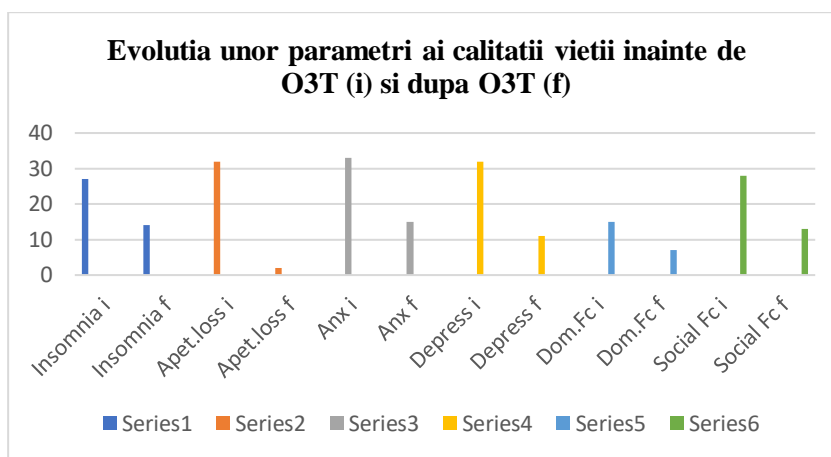


Figura 5.17: Influența O₃T asupra evoluției unor parametri ai calității vieții (QoL)

Rezultatele obținute - prelucrate prin metoda **Wilcoxon Signed Ranks Test** - sunt prezentate în Tabelul 5.4.

Tabel nr. 5.4: Rezultatele obținute și analiza statistică

	Variabila	Initial	Final	Valoarea P
1	Parox.D (NPRS=0-10)	9.00 [8.00, 10.00]	2.00 [1.00, 3.00]	0.000001
2	Frecv Parox.D	3.00 [2.00, 5.00]	13.00 [9.00, 17.00]	0.000000
3	FD (NPRS=0-10)	7.00 [6.00, 8.00]	2.00 [1.00, 3.00]	0.007110
4	Consum de analgezice/ (0-4)	3.00 [2.00, 3.00]	1.00 [1.00, 1.00]	0.000003
5	Insomnie (0-4)	2.00 [1.00, 2.50]	0.00 [0.00, 1.00]	0.000021
6	Anxietate (0-4)	3.00 [2.00, 3.00]	1.00 [0.00, 1.00]	0.000001
7	Descurajare (0-4)	2.00 [1.00, 3.00]	0.00 [0.00, 1.00]	0.000001
8	Viz.catastrof.	0.00 [0.00, 1.50]	0.00 [0.00, 0.50]	0.002700
9	Scadere a apetitului alimentar	1.00 [1.00, 2.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.000001
10	Funcționalitate (autoîngrijire/casnică) -	1.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.000162
11	Funcționalitate -(aprovizionare)	1.00 [0.00, 2.00]	0.00 [0.00, 1.00]	0.000011
12	Funcționalitate - (activitate profesională)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.002551
13	Funcționalitate - (activitate socială)	2.00 [1.00, 2.00]	0.00 [0.00, 1.00]	0.000003
14	Hiperestezie (1 - 5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.038434
15	Hipoalgezie mecanică (-1) - (-5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.317311
16	Hiperalgezie mecanică (+1) - (+5)	0.00 [0.00, 2.00]	0.00 [0.00, 1.00]	0.000311
17	Hipoalgezie la cald (-1) - (-5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.157299
18	Hiperalgezie la cald (+1) - (+5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.002700
19	Hiperalgezie la rece (1 - 5)	0.00 [0.00, 2.00]	0.00 [0.00, 0.50]	0.001341
20	Alodinie (0 - 5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.083265
21	Hipoestezie vibratorie (-1) - (-5)	0.00 [0.00, 1.00]	0.00 [0.00, 0.00]	0.002700

Concluziile studiului privind aplicarea O₃T în nevralgia de trigemen:

- Cercetarea oferă dovezi pentru aplicarea O₃T ca instrument eficient de modulare a durerii, prin legatura de cauzalitate între acțiunile multimodale ale O₃ medical și procesele neuropatogenice aflate la originea NT;
- Tratamentul medicamentos utilizat anterior de pacienți era fără rezultate sau dificil de tolerat prin existența reacțiilor adverse. O₃T a crescut tolerabilitatea tratamentului neurotrop, prin sinergia efectelor și printr-o metabolizare mai eficientă a acestuia, făcând posibilă scăderea dozelor necesare și chiar renunțarea la acest tratament [81];
- O₃ medical a acționat indiferent de vechimea bolii - recentă sau cu evoluție îndelungată - și în ciuda factorilor nefavorabili (vârsta pacienților, comorbidități etc.), iar efectele sale au persistat în timp.

Elemente de originalitate:

1. Utilizarea de teste simple, ușor reproductibile „la patul bolnavului” (sQST) pentru tulburările de sensibilitate, permițând conturarea unui fenotip senzorial caracteristic al pacienților selectați, util pentru precizarea substratului anatomic și pentru predictibilitatea răspunsului la tratament (Figura 5.18). Se pare că această lucrare este **primul studiu privind O₃T aplicată în TN care utilizează aceste teste;**

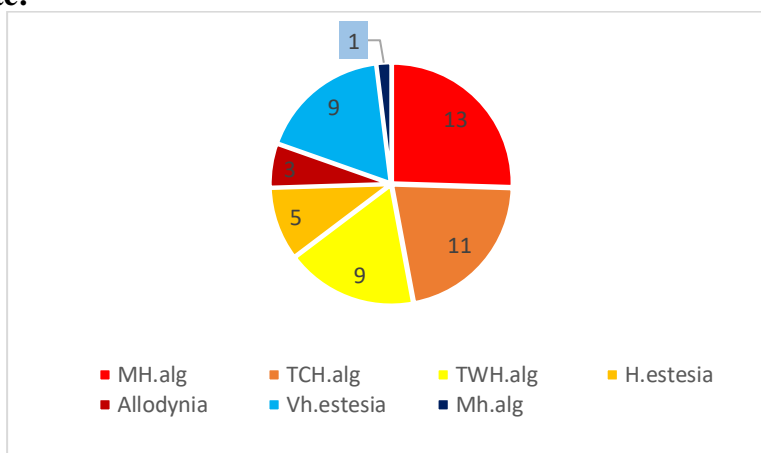


Figura 5.18: Tulburări senzoriale în studiul NT

2. Aplicarea particulară a ozonului - prin injecții subcutanate efectuate nu doar în zona dureroasă, ci și simetric în alte puncte cefalice și cervico-dorso-lombare; aceste aplicații loco-regionale au acționat asupra: homeostaziei oxidative locale, substratului inflamator și hipoxic, sensibilizării periferice, modulării nociceptive, regenerării țesutului nervos;

3. O prezentare comparativă a mecanismelor etiopatogenice implicate în NT și efectul multifactorial al ozonului medical a fost prezentată în Tabelul 5.22.

Limitele studiului - studiu comparativ unicentric mic, cu pacienți selecționați, (deci ne-reprezentativ pentru populația generală), fără grup de control, nici model single/dublu-orb; urmărirea mai lungă nu a fost sistematică. Poate să apară remisiunea spontană a NT, în această situație trebuie clarificat dacă pacientul este în remisie sau a beneficiat de terapie.

-Evaluarea durerii / stării pacientului, a eficacității tratamentului pe baza chestionarelor și evaluarea sensibilității cu ajutorul testelor sQST pot fi influențate de factori subiectivi care sunt surse potențiale de eroare (bias);

Perspective de cercetare - Sunt necesare:

- Studii multicentrice cu criterii stricte de diagnostic și selecție și proceduri unitare, studii randomizate, controlate, cu dimensiuni mari ale eșantionului de pacienți, eventual cu aplicare în simplu-dublu-orb și cu perioade de urmărire post-studiu mai îndelungate;

-Aplicarea unor metode de profilare senzorială valide, fiabile și scalabile;

-Aprofundarea studiilor privind interactiunea O_3 medical și în alte patologii relevante.

Capitolul 6. Cercetări privind decolorarea prin ozonizare a mediilor apoase

Creșterea utilizării aditivilor alimentari (inclusiv a coloranților sintetici) a condus la prezența acestora în apele reziduale, cu impact asupra calității apelor de suprafață/de adâncime și a ecosistemelor aferente, unii coloranți fiind refractari la metodele convenționale de decolorare [145,147,148]. Astfel s-a considerat oportun studiul aprofundat al procesului de decolorare cu ozon, în acest scop fiind selectat colorantul Albastru Brilliant FCF (BB FCF) utilizat în industria alimentară, farmaceutică, chiar și în medicină. Informațiile cu privire la decolorarea BB FCF prin ozonizare sunt într-un număr redus, incomplete, uneori contradictorii, acestea fiind motivele orientării cercetării experimentale, în cadrul tezei, spre următoarele obiective:

- studiul parametrilor optimi pentru decolorarea prin ozonizare - fără modificare de pH;
- studiul influenței pH-ului asupra procesului de decolorare;
- studiul cinetic al reacțiilor care stau la baza decolorării BB FCF;
- identificarea produșilor de oxidare prin ozonizare;
- studiul ecotoxicității soluțiilor de BB FCF pre- și post-ozonizare asupra unor organisme nevertebrate și pești specifici apelor dulci din țară.

6.3.2 Studiul parametrilor optimi pentru decolorarea prin ozonizare, fără modificare de pH - a urmărit randamentul decolorării prin ozonizare a unor soluții de colorant de diferite concentrații, supuse ozonizării cu diferite concentrații de ozon, la valori diferite ale timpului de contact, cu sau fără agitare mecanică.

Decolorarea prin ozonizare fără modificare de pH a soluției de colorant BB FCF – a confirmat că eficiența decolorării (%R) este strâns legată de concentrația inițială a colorantului (C_{iBB}) și de concentrația de ozon aplicată. Datele experimentale (Tabel 6.2) au condus la următoarele observații:

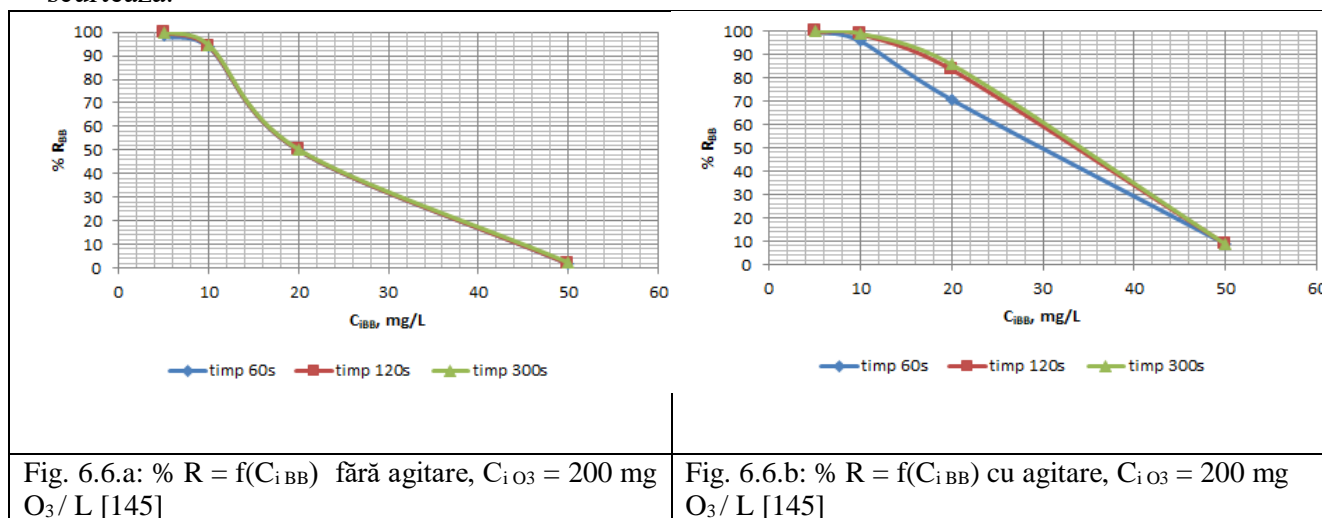
- eficiența procesului de decolorare (%R) crește odată cu concentrația de ozon aplicat la fiecare dintre valorile concentrației de colorant și la aceeași valoare a timpului de contact (300 s);
- la concentrații mici ale colorantului (5 mg/L), %R a fost semnificativ (99,2 – 99,9%) la toate concentrațiile de O_3 aplicate, dar eficiența decolorării scade la concentrații mai mari ale BB FCF, necesitând concentrații tot mai mari de O_3 ;
- factorul mecanic (agitare) are o influență favorabilă asupra ozonizării și implicit asupra eficienței decolorării;
- se poate afirma că o creștere mai mare de 200 mg O_3 /L nu are justificare economică având în vedere faptul că randamentul a crescut satisfăcător până la aplicarea acestei concentrații, acest argument fiind valabil și pentru concentrații mai mari de colorant (20 - 50 mg/L) ;
- rezultatele cercetării au mai subliniat și influența purității ozonului asupra procesului de oxidare, ozonul fiind obținut din oxigen de puritate 99,5%.

Tabelul 6.2. Eficiența decolorării prin ozonizare a sistemelor apoase studiate

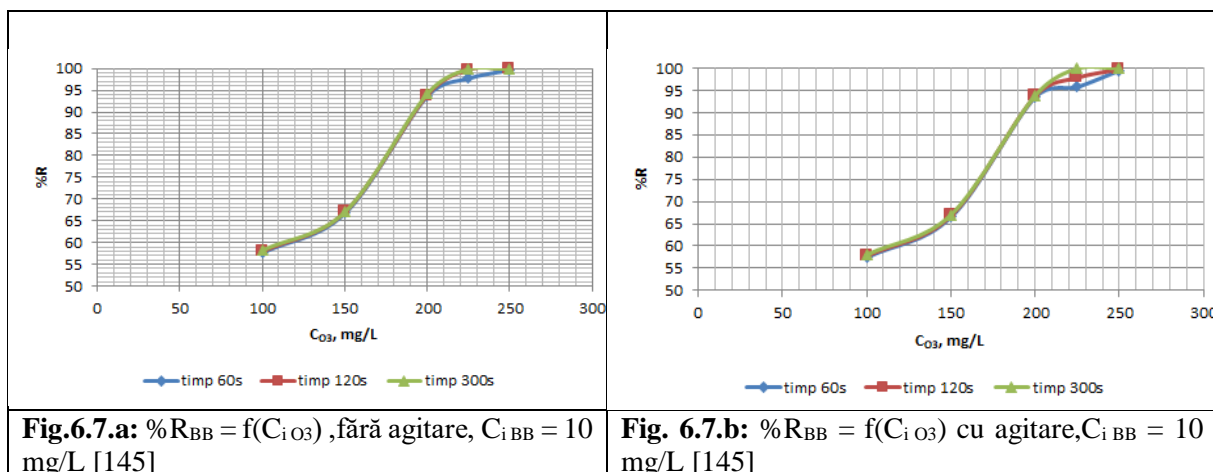
C_{iBB} (mg / L)	Fără agitare		Cu agitare	
	C_{fBB} (mg / L)	%R	C_{fBB} (mg / L)	%R
Ozonizare cu 100 mg O_3 /L				
5	0,08	98,4	0,04	99,2
10	4,18	58,2	1,46	85,4
20	12,20	39,0	6,32	68,4
50	49,2	1,6	46,00	8,0
Ozonizare cu 150 mg O_3 /L				

5	0,06	98,8	0,03	99,4
10	3,30	67,0	0,66	93,4
20	10,00	50,0	5,10	74,3
50	49,00	2,0	45,50	9,0
Ozonizare cu 200 mg O₃ /L				
5	0,01	99,8	0,01	99,8
10	0,58	94,2	0,12	98,8
20	10,00	50,0	2,88	85,6
50	48,90	2,2	45,50	9,0
Ozonizare cu 250 mg O₃ /L				
5	0,007	99,9	0,007	99,9
10	0,01	99,9	0,01	99,9
20	9,40	53,0	1,96	90,2
50	48,60	2,8	44,5	11,0

Timp de contactare - În intervalul de timp 0 - 300 s se obține o eficiență de decolorare (%R = 98,8) pentru soluția de colorant (10 mg/L) sub acțiunea unei doze de ozon (200 mg O₃/L), când graficul prezintă un aspect de platou... influența pozitivă a agitării, care, în domeniul de concentrații ($C_{i\text{BB}} = 5 - 10 \text{ mg / L}$), la timpul de contactare de 300 s, a mărit eficiența decolorării (% R > 90)... Experimentele s-au realizat cu aceleași soluții de BB FCF de concentrații diferite (5, 10, 20 și 50 mg / L), care s-au ozonizat, pe rând, cu doze de câte 200 mg O₃ / L a. g., la timpi de contact diferiți (60, 120 și 300 s). Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 6.6.a și 6.6.b...la doze de ozon crescătoare, **timpul de contactare** necesar decolorării se scurtează.



Următoarea etapă a fost **optimizarea concentrației de ozon** folosită la decolorarea BB FCF. Pentru desfășurarea acestei etape s-a lucrat, în continuare, cu soluția $C_{i\text{BB}} = 10 \text{ mg / L}$, care a reacționat bine la ozonizare, cu diferite concentrații de ozon (100, 150, 200 și 250 mg O₃ / L a. g.), la un timp de contactare de 300 s (Fig. 6.7.a și 6.7.b).



Concluzie preliminară - Eficiența decolorării a fost maximă în cazul concentrațiilor mici de colorant (10 mg/L), la care s-au aplicat concentrații mari de ozon (200 mg O₃ / L a. g.), în condiții de agitare mecanică (200 rot / min), la o valoare de pH = 7,03.

6.4 Influența pH-ului asupra procesului de decolorare

Această cercetare prezintă un interes deosebit deoarece literatura de specialitate arată că în soluțiile apoase molecula BB FCF se găsește în forme acido-bazice într-o stare de echilibru dependentă de aciditatea, respectiv alcalinitatea mediului [277,292]; astfel poate fi explicat mecanismul particular al decolorării prin ozonizare, oxidarea desfășurându-se la pH acid preponderant prin mecanism direct, selectiv, atribuit ozonului molecular (majoritatea autorilor îl atribuie oxigenului născând), iar la pH alcalin prin mecanism indirect, neselectiv, datorat radicalilor hidroxil [291,292].

6.4.1. Decolorarea la pH acid

A fost studiată eficiența decolorării pentru diferite concentrații ale BB FCF (2,5, 5,0, 7,5 și 10,0 mg / L) la concentrația de ozon cea mai mică studiată, de 100 mg O₃ / L a. g.), pH = 4,00, timp de 90 s, în cele două variante: fără agitare și cu agitare la 200 rot / min.

Din datele experimentale se observă un randament maxim de decolorare ($\%R > 99,9$) la concentrația $C_{iBB} = 2,5$ mg / L, atât la varianta cu agitare cât și la cea fără agitare, la un timp de contact de 90 s. Astfel, valorile determinate experimental, la concentrații mici de BB FCF, sunt într-o bună concordanță cu cele menționate în literatură. În tabelul 6.4 sunt prezentate valorile obținute în condițiile menționate.

Tabelul 6.4. Eficiența decolorării prin ozonizare a sistemelor apoase studiate la pH = 4 și diferiți timpi de contact

τ_{contact} (s)	Fără agitare		Cu agitare	
	C_{iBB} (mg / L)	%R	C_{iBB} (mg / L)	%R
C_{iBB} (2,5 mg / L)				
15	0,52	79,2	0,14	94,4
30	0,30	88,0	0,09	96,4
45	0,22	91,2	0,06	97,6
60	0,15	94,0	0,03	98,8
75	0,02	99,2	ND	>99,9
90	ND	>99,9	ND	>99,9
C_{iBB} (5,0 mg / L)				
15	1,09	78,2	0,32	93,6
30	0,74	85,2	0,23	95,4
45	0,48	90,4	0,13	97,4
60	0,30	94,0	0,06	98,8
75	0,05	99,0	0,01	99,8

90	0,01	99,8	0,01	99,8
C_{iBB} (7,5 mg / L)				
15	1,78	76,3	0,94	81,2
30	1,25	83,3	0,62	91,7
45	1,06	85,9	0,35	95,0
60	0,68	91,0	0,12	98,4
75	0,44	94,1	0,07	99,1
90	0,18	97,6	0,03	99,6
C_{iBB} (10,0 mg / L)				
15	2,64	73,6	1,92	80,8
30	2,25	77,5	1,12	88,88
45	1,98	80,2	0,77	92,3
60	1,57	84,3	0,34	96,6
75	1,28	87,2	0,12	98,8
90	1,08	89,2	0,07	99,3

6.4.2 Decolorarea prin ozonizare la pH neutru

A fost studiată eficiența decolorării pentru diferite concentrații ale BB FCF (2,5, 5,0, 7,5 și 10,0 mg / L) la concentrația de ozon de 100 mg O₃ / L a. g.), pH = 7,00, timp de 900 s, în cele două variante: fără agitare și cu agitare la 200 rot / min. În Tabelul 6.5. sunt prezentate valorile obținute în aceste condiții.

Tabelul 6.5. Eficiența decolorării prin ozonizare a sistemelor apoase studiate la pH = 7 și diferiți timpi de contactare

τ_{contact} (s)	Fără agitare		Cu agitare	
	C _{iBB} (mg / L)	%R	C _{iBB} (mg / L)	%R
C_{iBB} (2,5 mg / L)				
15	1,27	49,2	0,34	86,4
30	0,95	62,0	0,20	92,0
45	0,82	67,2	0,12	95,2
60	0,72	71,2	0,09	96,4
75	0,55	78,0	0,08	96,8
90	0,34	86,4	0,07	97,2
105	0,15	94,0	0,06	97,6
120	0,06	97,6	0,03	98,8
300	0,04	98,4	0,02	99,2
600	0,02	99,2	0,01	99,6
900	0,01	99,6	ND	>99,9
C_{iBB} (5,0 mg / L)				
15	2,32	53,6	0,68	86,4
30	1,83	63,4	0,38	92,4
45	1,51	69,8	0,22	95,6
60	1,23	75,4	0,16	96,8
75	1,06	78,8	0,12	97,6
90	0,62	87,6	0,10	98,0
105	0,33	93,4	0,09	98,2
120	0,12	97,6	0,06	98,8
300	0,08	98,4	0,04	99,2
600	0,04	99,2	0,02	99,6
900	0,02	99,6	0,01	99,8
C_{iBB} (7,5 mg / L)				
15	3,24	56,8	2,54	66,1
30	3,17	57,7	2,44	67,5

45	3,05	59,3	2,12	71,7
60	2,88	61,6	1,76	76,4
75	2,67	64,4	1,45	80,7
90	2,34	68,7	1,17	84,4
105	2,11	71,9	0,88	88,3
120	1,83	75,6	0,57	92,4
300	1,53	79,6	0,27	96,4
600	1,04	86,1	0,16	97,9
900	0,76	90,0	0,08	98,9
C_{iBB} (10,0 mg / L)				
15	4,24	57,6	3,22	67,8
30	4,23	57,7	3,12	68,8
45	4,23	57,7	3,04	69,6
60	4,22	57,8	2,76	72,4
75	4,22	57,8	2,52	74,8
90	4,21	57,9	2,38	76,2
105	4,21	57,9	2,14	78,6
120	4,20	58,0	1,72	82,8
300	4,18	58,2	1,46	85,4
600	4,18	58,2	1,14	88,6
900	4,18	58,2	0,98	90,2

Din datele experimentale se observă un randament maxim de decolorare (%R >90,0) la concentrația C_{iBB} = 2,5 mg / L și 5,0 mg / L, atât la varianta cu agitare cât și la cea fără agitare, la un timp de contact de 105 s (mai mare decât în varianta cu pH acid). La concentrații mai mari de 5 mg/L BB FCF (C_{iBB} = 7,5 mg/L și 10,0 mg/L) se observă randamente maxime de decolorare (%R >90,0) doar la un timp de contact de 900 s și numai în varianta cu agitare. În literatura de specialitate nu s-au găsit studii la acest pH, fiind o parte din originalitatea tezei.

6.4.3. Decolorarea prin ozonizare la pH alcalin

În Tabelul 6.6. se prezintă valorile eficienței decolorării pentru diferite concentrații ale BB FCF (2,5, 5,0 , 7,5 și 10,0 mg / L) la concentrația de ozon cea mai mică studiată, de 100 mg O₃/L a. g.), pH = 10,00, timp de 60 s în cele două variante: fără agitare și cu agitare la 200 rot / min.

Tabelul 6.6. Eficiența decolorării prin ozonizare a sistemelor apoase studiate la pH = 10 și diferiți timpi de contactare

τ _{contact} (s)	Fără agitare		Cu agitare	
	C _{iBB} (mg / L)	%R	C _{iBB} (mg / L)	%R
C_{iBB} (2,5 mg / L)				
15	0,42	83,2	0,03	98,8
30	0,28	88,8	0,02	99,2
45	0,09	96,4	0,01	99,6
60	ND	>99,9	ND	>99,9
C_{iBB} (5,0 mg / L)				
15	0,90	82,0	0,08	98,4
30	0,64	87,2	0,04	99,2
45	0,18	96,4	0,02	99,6
60	0,09	98,2	0,01	99,8
C_{iBB} (7,5 mg / L)				
15	1,38	81,6	0,78	89,6
30	0,83	89,0	0,33	95,6
45	0,38	95,0	0,10	98,7
60	0,25	96,7	0,06	99,2
C_{iBB} (10,0 mg / L)				

15	2,08	79,2	1,42	85,8
30	1,63	83,7	0,64	93,6
45	0,95	90,5	0,25	97,5
60	0,43	95,7	0,08	99,2

La pH=10 se constată randamente maxime (%R >99,9) la concentrația $C_{iBB}=2,5$ mg/L, în ambele variante, dar la un timp de contact mult mai mic de 60 s. Și aceste valori determinate experimental sunt într-o bună concordanță cu cele menționate în literatură.

Valorile pH-ului de 4,0; 7,0 și 10,0 au favorizat decolorarea BB FCF. Acest lucru s-a datorat efectelor predominante ale ozonului molecular, la pH acid, și efectelor radicalilor hidroxil, la pH alcalin. La pH neutru se presupune un efect echilibrat al ozonului molecular și al radicalilor hidroxil, dar decolorarea necesită un timp de contactare mai lung (ajungând până la 900 s)....

6.4.4 Validarea parametrilor (Reproductibilitatea decolorării)

S-a verificat reproductibilitatea decolorării pentru fiecare sistem studiat (Tabelul 6.7).

Tabelul 6.7. Reproductibilitatea decolorării BB FCF prin ozonizare

Nr. Probă	Caracteristici probă decolorată (ozonificată)	C_{iBB} , mg / L		Probabilitate statistică 95%	
		Cu agitare	Fără agitare	Probă ozonificată cu agitare	Probă ozonificată fără agitare
1	$C_{iBB} = 5$ mg / L $V_{probă} = 100$ cm ³ pH \cong 4,0 $\tau_{contact} = 90$ s	0,01	0,02	$\bar{X} = 0,0128$ $S = 0,0002$ $S_{\bar{X}} = 0,0049$	$\bar{X} = 0,0180$ $S = 0,0005$ $S_{\bar{X}} = 0,0049$
2		0,02	0,03		
3		0,009	0,02		
4		0,01	0,01		
5		0,02	0,01	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0111$	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0111$
6		0,01	0,02	$C_{iBB} = 0,0128 \pm 0,0111$	$C_{iBB} = 0,0180 \pm 0,0111$
7		0,01	0,01		
8		0,009	0,03	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0158$	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0158$
9		0,01	0,02	$C_{iBB} = 0,0128 \pm 0,0158$	$C_{iBB} = 0,0180 \pm 0,0158$
10		0,02	0,01		
1	$C_{iBB} = 5$ mg / L $V_{probă} = 100$ cm ³ pH \cong 7,0 $\tau_{contact} = 900$ s	0,04	0,08	$\bar{X} = 0,0340$ $S = 0,0012$ $S_{\bar{X}} = 0,0051$	$\bar{X} = 0,0800$ $S = 0,0004$ $S_{\bar{X}} = 0,0052$
2		0,03	0,07		
3		0,03	0,08		
4		0,05	0,09		
5		0,02	0,08	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0115$	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0115$
6		0,02	0,08	$C_{iBB} = 0,0340 \pm 0,0115$	$C_{iBB} = 0,0800 \pm 0,0115$
7		0,03	0,07		
8		0,04	0,08	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0164$	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0164$
9		0,04	0,09	$C_{iBB} = 0,0340 \pm 0,0164$	$C_{iBB} = 0,0800 \pm 0,0164$
10		0,05	0,08		
1	$C_{iBB} = 5$ mg / L $V_{probă} = 100$ cm ³ pH \cong 10,0 $\tau_{contact} = 60$ s	0,01	0,09	$\bar{X} = 0,0118$ $S = 0,0002$ $S_{\bar{X}} = 0,0052$	$\bar{X} = 0,0820$ $S = 0,0006$ $S_{\bar{X}} = 0,0052$
2		0,009	0,08		
3		0,02	0,07		
4		0,01	0,09		
5		0,01	0,08	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0115$	P=95%, t $S_{\bar{X}} = 0,0115$
6		0,01	0,08	$C_{iBB} = 0,0118 \pm 0,0115$	$C_{iBB} = 0,0820 \pm 0,0115$
7		0,009	0,09		
8		0,01	0,07	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0164$	P=99%, t $S_{\bar{X}} = 0,0164$
9		0,02	0,08		

10		0,01	0,09	$C_{iBB}=0,0118 \pm 0,0164$	$C_{iBB}=0,0820 \pm 0,0164$
----	--	------	------	-----------------------------	-----------------------------

6.5. Aspecte ale cineticii procesului de decolorare a BB FCF cu ozon

În cercetarea experimentală pentru estimarea cineticii de ozonizare au fost alese două variante de lucru, la temperatura camerei, pentru trasarea curbelor $C_{BB} = f(t)$:

1. soluție apoasă BB FCF de concentrație constantă (5 mg / L) și concentrație variabilă de ozon pe intervalul de concentrație (100 - 250 mg O₃ / L a.g.) la trei nivele medii de pH (acid, neutru și bazic) cu și fără agitare, la timpi variabili de contactare colorant – ozon (0 - 10 min la pH = 7, 0 - 1,5 min la pH = 4 și 0 - 1 min la pH = 10);
2. concentrație constantă de ozon (100 mg O₃ / L a.g.) și soluție apoasă BB FCF de concentrație variabilă, în intervalul de concentrații (2,5 - 10 mg / L), în aceleași condiții ca la punctul 1.

6.5.1. Cercetari preliminare

Cinetica de reacție a decolorării soluției apoase BB de către ozon a fost studiată prin estimarea variației concentrației de colorant în timpul interacțiunii reciproce la cele trei valori de pH, patru valori ale concentrației de ozon și 5 mg/L colorant. Pentru a determina ordinul probabil de reacție, experimentul a fost realizat cu patru concentrații de ozon (100, 150, 200 și 250 mg/L), trei valori ale pH (pH = 4,0, pH = 7,0 și pH = 10,0), cu / fără agitare.

În Fig. 6.8.a, 6.8.b, 6.9.a, 6.9.b, 6.10.a și 6.10.b sunt prezentate variațiile în timp ale concentrațiilor BB FCF în timpul ozonizării, varianta a) fiind cu agitare și varianta b) fără agitare, la toate cele trei valori de pH studiate.

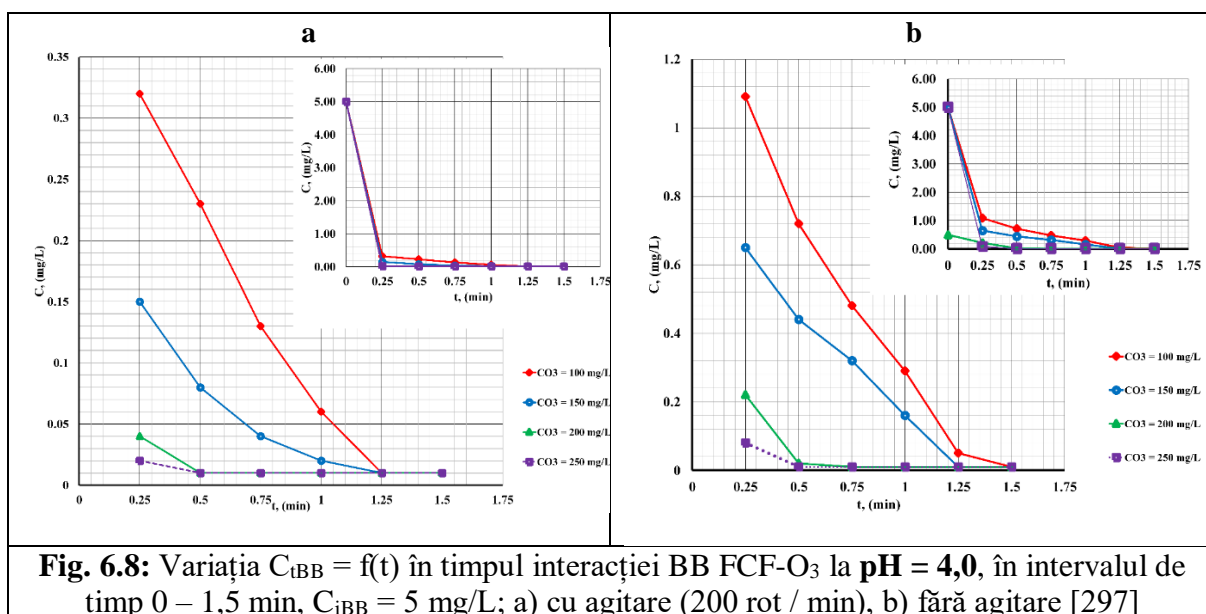


Fig. 6.8: Variația $C_{iBB} = f(t)$ în timpul interacției BB FCF-O₃ la pH = 4,0, în intervalul de timp 0 – 1,5 min, $C_{iBB} = 5$ mg/L; a) cu agitare (200 rot / min), b) fără agitare [297]

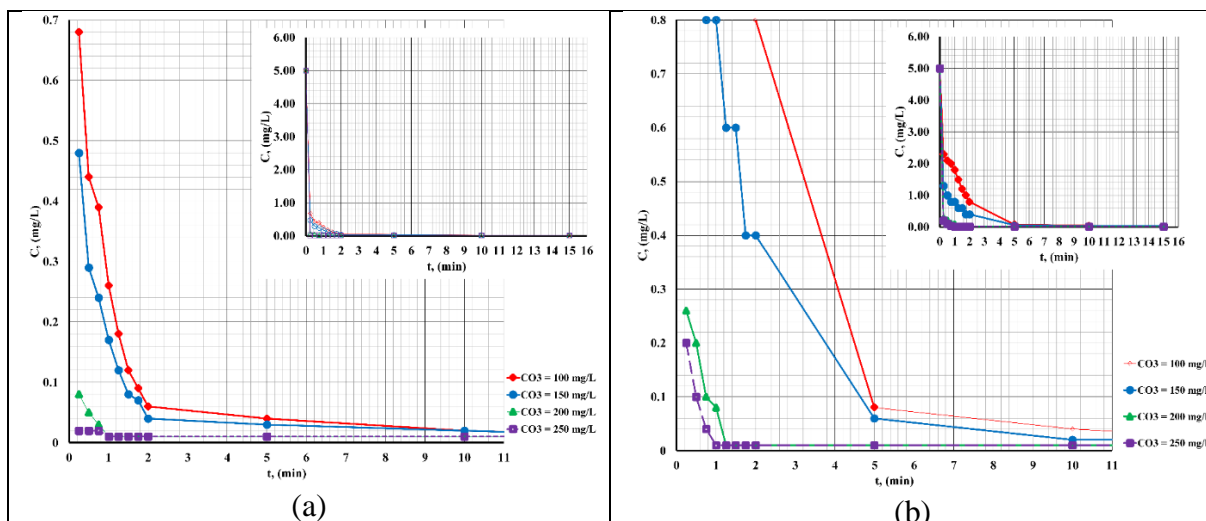


Fig. 6.9: Variația $C_{iBB} = f(t)$ în timpul interacției BB FCF- O_3 la $pH = 7,0$, în intervalul de timp 0 – 1,5 min, $C_{iBB} = 5 \text{ mg/L}$; a) cu agitare (200 rot / min), b) fără agitare [297]

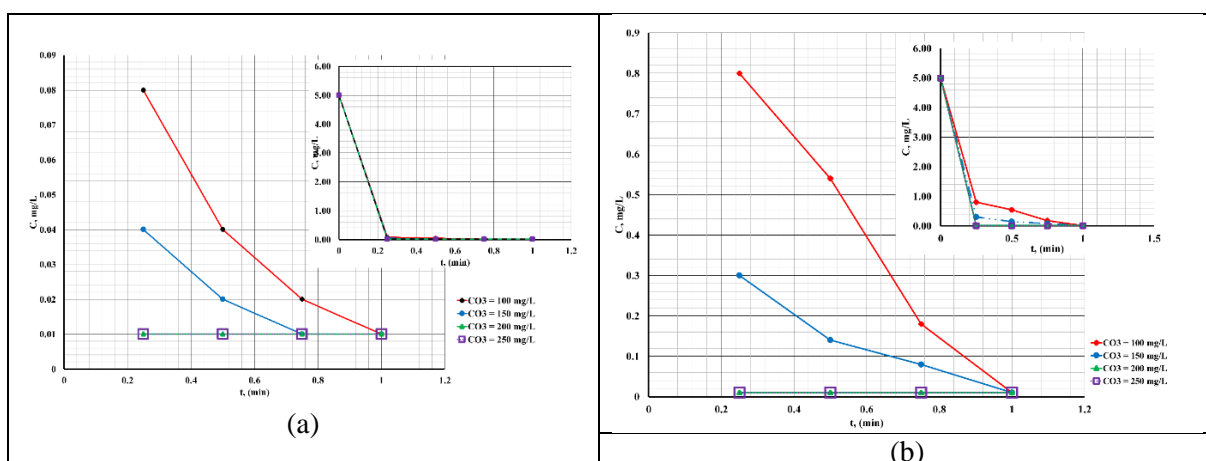


Fig. 6.10. Variația $C_{iBB} = f(t)$ în timpul interacției BB FCF- O_3 la $pH = 10,0$, în intervalul de timp 0 – 1,5 min, $C_{iBB} = 5 \text{ mg/L}$; a) cu agitare (200 rot / min), b) fără agitare [297]

În toate variantele (cu sau fără agitare) viteza de reacție este mai mare la concentrații mai mari de ozon. Acestor rezultate experimentale li s-au aplicat modelele cinetice clasice de ordinul 1 și 2, folosind metoda integrală. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.9.

Tabelul 6.9. Parametrii cinetici calculați pentru ordinul de reacție prin metoda integrală, la diferite valori de pH și diferite concentrații de ozon, $C_{iBB} = 5 \text{ mg/L}$

C_{i,O_3} mg/ L	N	$pH = 4$				$pH = 7$				$pH = 10$			
		k, min^{-1}		R^2		k, min^{-1}		R^2		k, min^{-1}		R^2	
		*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
100	1	-3,14	-3,65	0,93	0,89	-0,25	0,35	0,78	0,90	-2,77	-5,70	1	0,86
	2	89,18	63,16	0,76	0,57	6,24	3,29	0,97	0,98	115	119,98	0,92	0,64
150	1	-2,34	-3,76	0,97	0,87	-0,22	0,31	0,73	0,88	-1,94	-4,31	0,89	0,91
	2	86,19	90,13	0,91	0,71	6,08	3,97	0,96	0,94	110	4,32	0,90	0,91
200	1	-0,79	-2,00	0,43	0,57	0,07	0,14	0,16	0,24	-6×10^{-15}	-6×10^{-15}	N/A	N/A
	2	0,79	2,00	0,43	0,57	3,20	8,21	0,17	0,27	0	-6×10^{-15}	N/A	N/A

250	1	-0,40	-1,19	0,43	0,43	-0,03	0,09	0,17	0,16	-6×10^{-15}	-6×10^{-15}	N/A	N/A
	2	28,57	50,00	0,43	0,43	2,04	3,55	0,17	0,17	0	-6×10^{-15}	N/A	N/A

*cu agitare, **fără agitare

Din variația $C_{i, BB} = f(t)$ au fost observate **urmatoarele**:

- varianta cu amestecare este mai eficientă decât cea fără amestecare;
- la pH = 4,0 decolorarea completă apare după 1,25 min (pentru $C_{i, O_3} = 100$ mg/L și 150 mg/L) și respectiv după 0,50 min (pentru $C_{i, O_3} = 200$ mg/L și 250 mg/L);
- la pH = 7,0 decolorarea completă apare după 10 min (pentru $C_{i, O_3} = 100$ mg/L și 150 mg/L) și respectiv după 1 min (pentru $C_{i, O_3} = 200$ mg/L și 250 mg/L);
- la pH = 10,0 concentrația finală de BB este mult mai mică într-un timp mai scurt (0,2 min) față de valorile pH-ului studiate anterior, probabil datorită eficienței crescute de oxidare a radicalilor OH.

În medii acide și, respectiv, alcaline, reacțiile sunt rapide și nu se pot interpreta prin modelele cinetice clasice de ordinul 1 și 2 (Tabelul 6.9, constante de viteză negative).

Aceste concluzii confirmă faptul că în procesul de ozonizare sunt importanți factorii, precum: valoarea pH, concentrația de ozon, concentrația de BB FCF, agitarea cu efect asupra componentei de transfer de masă a întregului proces. În plus, având în vedere că decolorarea BB FCF prin ozonizare apare cu posibilități multiple de atac (în principal la grupări cromofore), este important să se țină cont și de acest aspect; în acest scop, a fost înregistrat spectrul de masă $^1\text{H-RMN}$ (Fig. 6.11) al unei probe. Este prezentată și o variantă de oxidare în conformitate cu rezultatele obținute la analiza spectrului de masă.

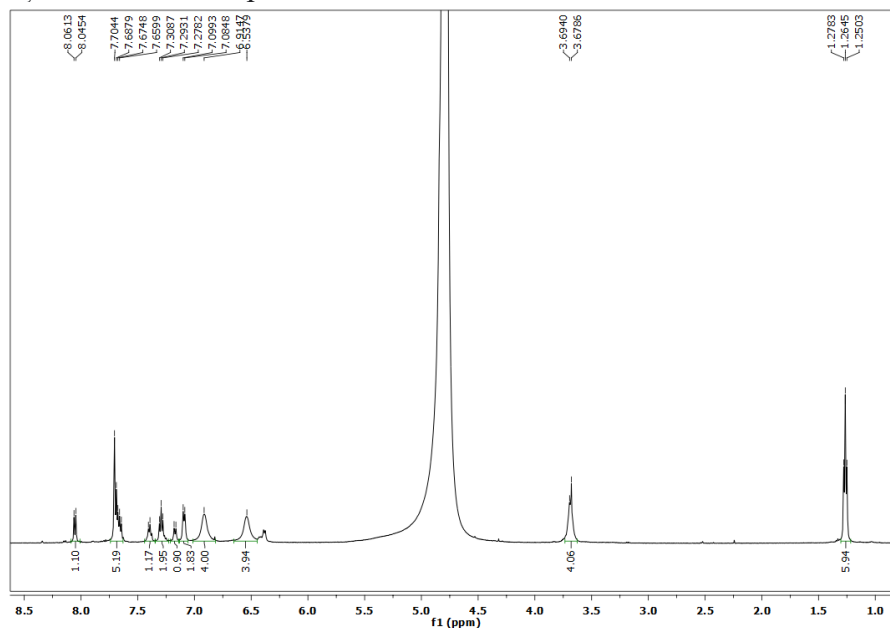


Fig. 6.11: Spectrul $^1\text{H-NMR}$ a colorantului BB FCF [297]

Ozonul poate oxida BB pe două căi:

- 1) Oxidare directă - Compușii tratați cu ozon formează ozonide, care, în prezența apei, formează aldehide și cetone;
- 2) Generarea de radicali liberi intermediari, cum ar fi radicalul $\text{OH}\cdot$, care este un agent oxidant puternic, eficient și neselectiv.

Pentru studierea cineticii reacțiilor procesului de ozonizare a colorantului BB FCF a fost luat în considerare **doar mecanismul radicalic**.

O **cale de degradare propusă** a BB FCF în soluție apoasă folosind ozon, este ilustrată în Fig. 6.12 și confirmă datele din literatura [148].

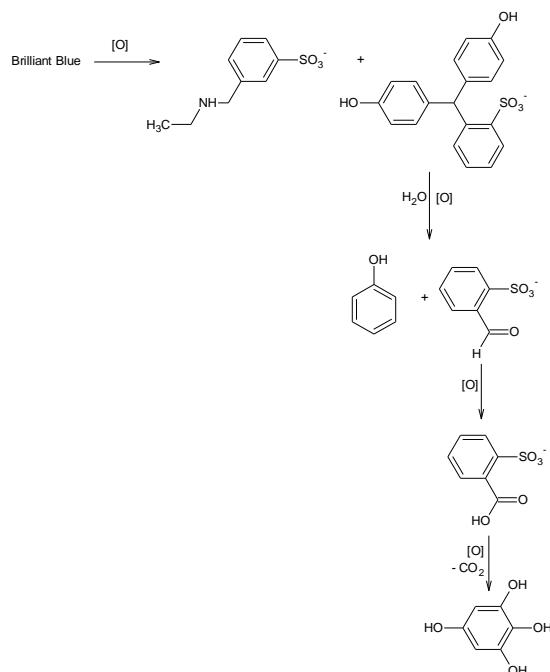


Fig. 6.12: Degradarea BB din soluții apoase prin ozonizare [297]

Se menționează că, pe baza condițiilor inițiale, ultima etapă de reacție nu este observabilă cinetic.

Coroborând datele obținute prin spectroscopie RMN cu datele din literatură [148] se confirmă existența a patru produse secundare de degradare în amestecul ozonizat:

	$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, D_2O , δ ppm, J Hz): 8,14 (m, 1H, H-2), 7,90-7,89 (m, 2H, H-4 și H-6, suprapuse cu alte semnale aromatice de la compuși rezultați din degradarea BB), 7,78 (t, 1H, H-5, 7,85 Hz), 4,32 (s, 1H, H-7), 3,05 (q, 2H, CH_2 din etil, 7,40 Hz), 1,28 (t, 3H, CH_3 din etil, 7,40 Hz)
	$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, D_2O , δ ppm, J Hz): 7,90-7,89 (m, 1H, H-6, suprapuse cu alte semnale aromatice de la compuși rezultați din degradarea BB), 7,63-7,62 (m, 3H, H-3, H-4 și H-5), 7,30-7,26 (m, 4H, H-9 și H-13), 7,08-7,06 (m, 4H, H-10 și H-12), 5,35 (s, 1H, H-7)
	$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, D_2O , δ ppm, J Hz): 10,03 (s, 1H, CHO), 8,00 (m, 1H, H-4), 7,95 (m, 1H, H-5), 7,90-7,89 (m, 1H, H-3 și H-6, suprapuse cu alte semnale aromatice de la compușii rezultați din degradarea BB)
	$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, D_2O , δ ppm, J Hz): 6,39 (s, 2H, H-3 și H-5)

Mai multe studii au menționat faptul că produșii secundari de oxidare sunt mai toxici decât soluția inițială de colorant [148, 282,294, 296].

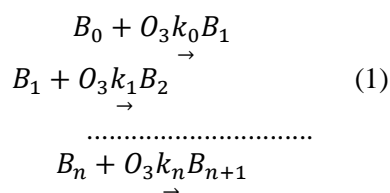
Astfel, ideea de modelare cinetică este motivată atât de complexitatea structurii colorantului cât și de posibilitățile sale multiple de scindare în funcție de condițiile de atac, întrucât sunt prea multe necunoscute și nici stoichiometria reacțiilor nu este cunoscută.

6.5.3. Modelare cinetică

Datorită complexității procesului de oxidare și a necunoașterii stoechiometriei reacțiilor s-a încercat, pe baza datelor experimentale obținute, să se propună un model cinetic pe baza unor ipoteze simplificatoare:

1. un număr finit de centre de reacție în molecula BB;
2. Reactivitățile acestor centre sunt suficient de diferite astfel încât să fie atacate succesiv. Pe baza acestor ipoteze rezultă că molecula de ozon reacționează cu cromoforul inițial la centrul său cel mai reactiv, apoi cu primul produs secundar de ozonizare la centrul său cel mai reactiv etc.
3. Primul atac distruge cromoforul, astfel încât viteza decolorării este proporțională cu viteza descompunerii BB;
4. Fiecare etapă de ozonizare urmează o cinetică aparentă de ordinul 2 (ordinul 1 atât pentru ozon cât și pentru substrat).

Conform acestor ipoteze simplificatoare, procesul global de ozonizare poate fi descris prin următorul lanț de reacții:



Modelarea transferului de masă se bazează pe teoria stratului dublu.

Ca o ipoteză simplificatoare suplimentară, raportul

$$\alpha = \frac{k_i}{k_{i-1}}$$

se presupune a fi independent de i. Aceasta înseamnă că diferența dintre energiile de activare, în etapele succesive ale lanțului (1), este aproximativ constantă. Sub această ipoteză, **modelul** reacție - difuzie devine în cele din urmă:

$$t = \beta_0 \ln \frac{C_0}{C_{B_0}} + \beta_1 (C_0 - C_{B_0}) + \sum_{n=1}^N \gamma_n \left[1 - \left(\frac{C_{B_0}}{C_0} \right)^{\alpha_n} \right] \dots\dots\dots (6)$$

Pentru a **valida** modelul (6), datele experimentale ar trebui să conțină suficiente informații cinetice.

La verificarea datelor disponibile, s-a decis selectarea următoarelor seturi pentru datele de dezintegrare a BB măsurate la pH = 7, cu agitare, cu diferite concentrații de BB și ozon:

1. C₀ = 2,5 mg/L, C_{O₃} = 100 mg/L;
2. C₀ = 5,0 mg/L, C_{O₃} = 100 mg/L;
3. C₀ = 7,5 mg/L, C_{O₃} = 100 mg/L;
4. C₀ = 10,0 mg/L, C_{O₃} = 100 mg/L;
5. C₀ = 5,0 mg/L, C_{O₃} = 150 mg/L.

Estimarea parametrilor a fost efectuată pe baza modelului (6) prin regresie liniară obișnuită, iar rezultatele (sub forma unei curbe cinetice calculate, reprezentată prin curba cu linie continuă neagră) reprezentate grafic de-a lungul datelor experimentale (sub forma unei curbe cu puncte de culoare roșie), pot fi vizualizate în Fig.6.13.

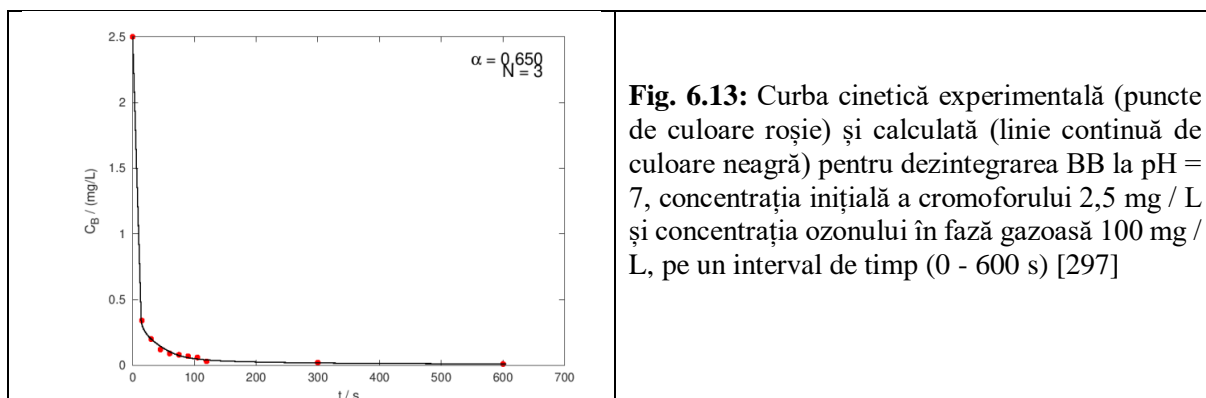


Fig. 6.13: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 2,5 mg / L și concentrația ozonului în fază gazoasă 100 mg / L, pe un interval de timp (0 - 600 s) [297]

Fig. 6.13 prezintă curbele cinetice experimentale și calculate pe întreg intervalul de timp al experimentului. Se poate observa că modelul (6) se fitează foarte bine pe setul de date experimentale. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că setul de date în sine nu oferă informații despre primele 15 secunde ale procesului, unde, după cum se pare, aproximativ 85% din cromoforul inițial se descompune. Prin urmare, modelul de regresie se bazează numai pe date din intervalul de timp (15 s, 600 s), care acoperă dezintegrarea a mai puțin de 15% din cromoforul original. Fig. 6.14 oferă o privire mai atentă asupra relației dintre modelul (6) și datele experimentale pe intervalul de timp relevant. După cum se poate observa clar, chiar și la această scară mult mai mică, acordul dintre model și date este foarte bun.

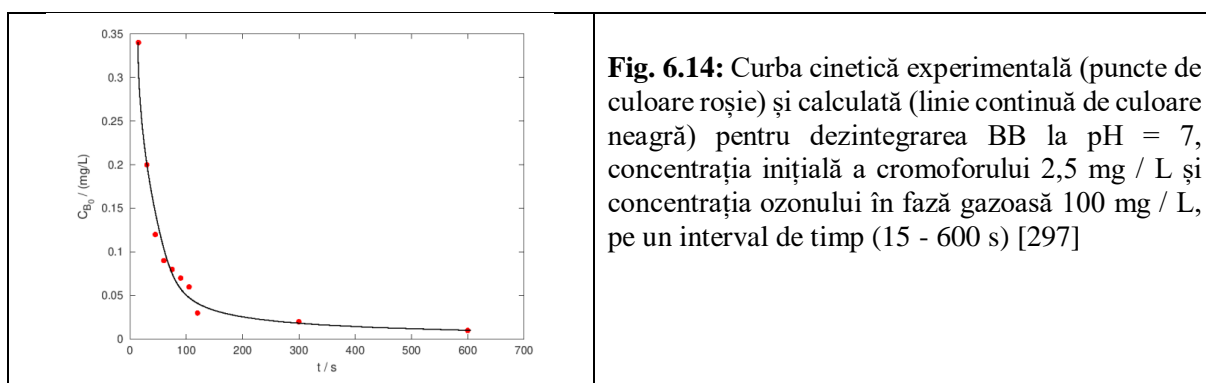


Fig. 6.14: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 2,5 mg / L și concentrația ozonului în fază gazoasă 100 mg / L, pe un interval de timp (15 - 600 s) [297]

Observații similare pot fi făcute în legătură cu toate celelalte seturi de date.

Figurile 6.15, 6.16 și 6.17 prezintă relațiile dintre curbele cinetice calculate și experimentale, măsurate la pH = 7, concentrația inițială de ozon în faza gazoasă 100 mg/mL și concentrațiile inițiale de cromofor 5 mg/L, 7,5 mg/L și 10 mg/L. În toate cazurile, este clar că modelul (6) și datele experimentale se fitează foarte bine. De asemenea, pe aceste grafice sunt reprezentate valorile meta-parametrului de reactivitate și lungimea lanțului (α și respectiv N).

După cum se poate observa, ambele valori optime pentru acești parametri se modifică ușor odată cu concentrația inițială a cromoforului. Mai precis, parametrul de lungime a lanțului scade de la 3 (la concentrația inițială de cromofor $C_0 = 2,5$ mg/mL) la 2 (la concentrații inițiale de cromofor mai mari). O posibilă explicație pentru aceasta este că, pe măsură ce concentrația inițială a substratului crește, din ce în ce mai puțin ozon este lăsat disponibil pentru atacurile ulterioare asupra produselor secundare de ozonizare primară și secundară, astfel încât numărul de reacții consecutive din lanțul (1) scade. Modificarea parametrului de reactivitate, pe de altă parte, poate indica o modificare corespunzătoare a căii de reacție în sine, care se poate explica printr-o schimbare a identității chimice pentru produsele intermediare B_1, B_2, \dots, B_n în lanțul de reacție (1).

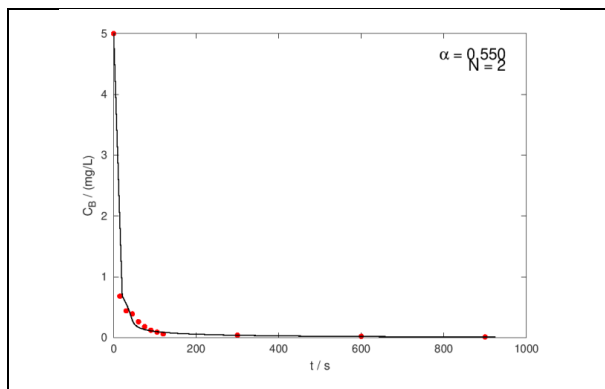


Fig. 6.15: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 5 mg/L și concentrația ozonului în fază gazoasă 100 mg/L, pe un interval de timp (0 - 600 s) [297]

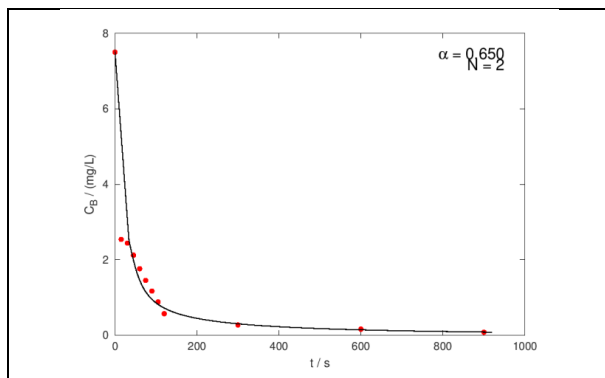


Fig. 6.16: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 7,5 mg/L și concentrația ozonului în fază gazoasă 100 mg/L, pe un interval de timp (0 - 600 s) [297]

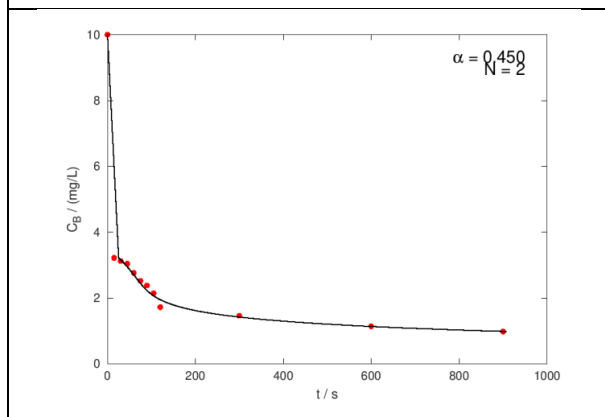


Fig. 6.17: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 10 mg/L și concentrația ozonului în fază gazoasă 100 mg/L, pe un interval de timp (0 - 600 s) [297]

În cele din urmă, Fig.6.18 arată relația model-vs-date pentru setul de date măsurat la $C_0 = 5$ mg/mL, pH = 7 și concentrația de ozon în fază gazoasă 150 mg/L.

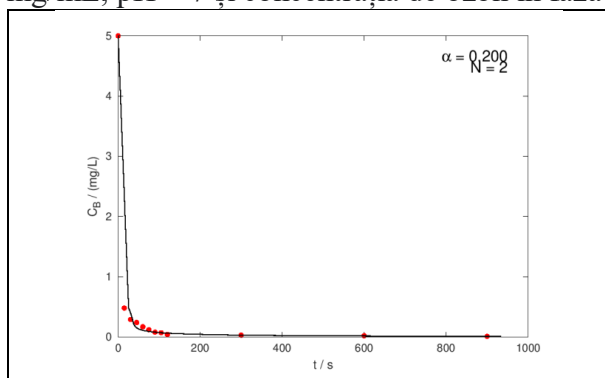


Fig. 6.18: Curba cinetică experimentală (puncte de culoare roșie) și calculată (linie continuă de culoare neagră) pentru dezintegrarea BB la pH = 7, concentrația inițială a cromoforului 5 mg/L și concentrația ozonului în fază gazoasă 150 mg/L, pe un interval de timp (0 - 900 s) [297]

În Figura 6.18 se observă clar că modelul (6) și datele experimentale sunt în acord foarte bun. Parametrul lungimii lanțului este la fel de scăzut ca înainte (excesul de ozon în fază lichidă este încă insuficient pentru a promova reacții ulterioare în lanțul (1)), dar parametrul de

reactivitate este chiar mai mic decât înainte. O posibilă explicație pentru micșorarea sa (ceea ce implică diferențe mai mari între energiile de activare în reacțiile consecutive ale lanțului (1)) este aceea că, la concentrații mai mari de ozon, mai multe centre de atac de pe cromoforul inițial pot fi atacate simultan, ceea ce duce la o creștere aparentă a reactivității sale, în raport cu cel al altor produse secundare, care reacționează cu ozonul în mai puține centre de atac (posibil, doar unul singur).

Rezultatele obținute în acest capitol al tezei de doctorat au permis să se facă **următoarele** evaluări pentru procesul de decolorare a BB FCF prin ozonizare:

1. Procesul de ozonizare a colorantului BB poate produce mai mulți compuși ca rezultat al oxidării, în funcție de condițiile inițiale de reacție, datorită complexității structurale a substratului;
2. Modelele cinetice clasice nu sunt aplicabile, deoarece produșii de oxidare inițiali pot fi ulterior ozonizați, astfel încât procesul real implică o succesiune de reacții în lanț;
3. Analiza spectroscopiei ¹H-RMN a fost efectuată la momentul decolorării. Rezultatele arată clar că decolorarea nu indică o mineralizare completă. În consecință, procesul trebuie continuat, după decolorarea inițială, pentru a se evita rămânerea în sistem a unor produși secundari noi, incolori, dar toxici;
4. Decolorarea BB FCF are loc prin reacții succesive care oferă o posibilitate de modelare a procesului luând în considerare atât difuzia ozonului din gaz în lichid cât și sistemul de reacție în lanț, în faza lichidă.

6.6. Toxicitatea colorantului BB FCF și ai produșilor de oxidare

Fiind cunoscută structura complexă și potențialul toxic asupra organismelor acvatice a colorantului BB FCF, necesitatea îndepărtării acestuia din mediile apoase (apele uzate industriale sau urbane) este evidentă. În timp s-au studiat diferite metode de îndepărtare a coloranților, procesele de ozonizare și oxidare avansată (AOP) fiind aplicate cu succes (Cap. 3.2, pag. 48). Majoritatea studiilor realizate în acest domeniu au subliniat însă obținerea unor produși intermediari (secundari) în condițiile unei mineralizări incomplete a colorantului, compuși care pot fi mai toxici decât colorantul inițial.

În Cap. 6.5.2 a fost semnalat prezența a patru produși de reacție în urma ozonizării colorantului studiat. În acest context s-a impus un studiu comparativ al ecotoxicității soluțiilor apoase de colorant BB FCF, înainte de ozonizare și a soluțiilor apoase rezultate după ozonizarea colorantului.

Studiul prezintă experimentările de determinare a toxicității exprimată prin concentrația letală mediană pentru 50% din populația test (LC₅₀) și concentrația efectivă mediană pentru 50% din populația test (EC₅₀) pe *Daphnia magna* (crustacee planctonice), *Selenastrum capricornutum* (micro-alge verzi) și *Cyprinus carpio* (puiet de crap de apă dulce) pentru cercetarea soluțiilor neozonizate de BB FCF, iar pentru soluțiile ozonizate s-a selectat doar *Daphnia magna*.

În cadrul cercetării s-au utilizat concentrații letale sau inhibitoare pentru 50% din organismele testate (LC₅₀ / EC₅₀). În prima etapă, toate organismele au fost expuse la soluții apoase de 0,01 - 100 mg / L BB FCF. Potențialul toxic a soluțiilor neutre și acide de BB FCF (1 până la 50 mg / L) tratate cu 200 mg O₃ / L s-a studiat doar pe *Daphnia magna*.

Soluția apoasă de BB FCF nu a prezentat toxicitate asupra peștilor și a crustaceelor (LC₅₀ / EC₅₀ > 100mg / L). Totuși, au fost observate efecte de toxicitate în cazul algelor. Soluțiile oxidate rezultate au prezentat o toxicitate ridicată pentru crustacee în comparație cu soluția apoasă a colorantului inițial.

Evaluarea eficienței decolorării (%R) - Toate soluțiile au fost tratate cu aceeași concentrație de ozon (200 mg/L g.m) pentru un timp de contact de 300 secunde, sub agitare continuă (200 rpm) cu obținerea unei eficiențe maxime de decolorare a soluțiilor experimentate

(Tabelul 6.10). Experimentul s-a realizat la pH-ul soluției BB FCF (pH = 7,05), cu excepția celor în care s-a evaluat și influența pH-ului când testele s-au efectuat la pH = 4,03.

Tabelul 6.10: Eficiența decolorării (%R) la soluțiilor de BB FCF utilizate în testele de toxicitate

Concentrația BB FCF (mg/L)	pH-ul soluției testate	%R
1	7,05	99,92
	4,03	99,94
2,5	7,05	99,81
	4,03	99,87
5	7,05	99,68
	4,03	99,74
10	7,05	98,80
	4,03	99,50
30	7,05	97,66
	4,03	98,94
50	7,05	96,82
	4,03	97,04

Teste de toxicitate - Experimentele de toxicitate au fost realizate în două etape:

- 1) testarea inițială a colorantului BB FCF în diferite concentrații preparate în diluție cu apa sau mediul de creștere;
- 2) testarea finală a soluțiilor BB FCF obținute postozonizare.

Pentru a evalua toxicitatea acvatică BB FCF, experimentele au fost efectuate inițial pe organisme nevertebrate (crustacee planctonice *Daphnia magna* și alge verzi de apă dulce *Selenastrum capricornutum* sau *Pseudokirchneriella subcapita*) pentru a evalua datele EC₅₀. Ulterior au fost aplicate bioteste cu pește *Cyprinus carpio* pentru evaluarea datelor LC₅₀. Testarea BB FCF a fost efectuată cu diferite concentrații în intervalul 0,01 - 100 mg/L. Soluțiile ozonizate au fost testate în intervalul 2,5 - 50 mg/L BB FCF. Testele s-au realizat atât pe soluții nediluate cât și pe soluții 50% diluate, cu sau fără pH ajustat. Organismele au fost expuse direct la soluțiile BB FCF, în condiții statice, până la 96h. Testele efectuate sunt prezentate în Tabelul 6.11.

Tabelul 6.11: Teste de toxicitate experimentate [300]

Specii	Test	Tipul testului	Efect final	Perioada de testare/incubație
<i>Cyprinus carpio</i>	OECD 203	Static, acut	Mortalitate, LC ₅₀ , Semne clinic	96h, 21-22°C
	OECD 202			
<i>Daphnia magna</i>	DAPTOXKIT F	Static, acut	Mortalitate/imobilizare, LC ₅₀	24-48h, 20°C
<i>Selenastrum capricornutum</i> / <i>Pseudokirchneriella subcapita</i>	OECD 201/ SR EN ISO 8692:2012 ALGALTOXKIT F	Static, acut	Inhibiția vitezei de creștere, ECr ₅₀	72h, 21-25°C

Toate testele de toxicitate acută au fost efectuate pentru soluții de colorant BB FCF în intervalul de concentrație 0,01-100 mg/L. Soluțiile apoase BB FCF nu au prezentat toxicitate pentru pești, având doar efecte letale/inhibitoare minore (5-20%) asupra *Daphnia magna* după 48 de ore de incubație (Tabelul 6.12).

Tabelul 6.12: Rezultatele toxicității acute asupra organismelor acvatice a soluțiilor apoase de BB FCF

Soluții testate	pH	Oxigen dizolvat	Efecte acute	Clasa de toxicitate
-----------------	----	-----------------	--------------	---------------------

(mg/L BB FCF)		mg/L	%	(LC ₅₀ /EC ₅₀ - mg/L)/ Clasificarea REACH
Test pești				
100	7,99	8,12	0	LC ₅₀ >100 mg/L Netoxic
10	7,94	7,36	0	
1	7,64	8,49	0	
Martor	7,64	7,60	0	
Test alge				
100	7,74	8,63	116,71	EC ₅₀ = 24 mg/L Nociv?? Testele au fost influențate de culoare (nu se pot considera date valide)
50	-	-	98,05	
20	-	-	9,01	
10	-	-	8,50	
5	7,69	8,63	-6,27	
Martor	7,49	8,74	-	
Test crustacea				
100	7,60	8,62	20	EC ₅₀ >100 mg/L Netoxic
50	7,03	-	20	
20	7,35	-	15	
10	7,35	-	10	
5	7,42	-	10	
1	7,38	-	5	
0,1	7,32	-	0	
0,01	7,28	8,66	0	
Martor	7,14	8,91	0	

Notă: valoare notată cu „- „ stimularea creșterii algelor; EC₅₀ se referă la concentrația efectelor asupra ratei de creștere a 50% din alge

EC₅₀ >100 mg/l indică lipsa unui impact nociv al colorantului asupra acestor organisme. Rezultate similare privind *Daphnia magna* au fost raportate pentru BB FCF între 97 mg/L și >1000 mg/L de bazele de date internaționale pentru înregistrarea chimică, cum ar fi baza de cunoștințe de ecotoxicologie (ECOTOX) [306] și alte organizații de mediu [307]. Conform Regulamentului privind categoriile de clasificare a substanțelor periculoase pentru mediul acvatic [305], BB FCF este clasificat ca netoxic pentru speciile de crustacee (*Daphnia*) (EC₅₀>100 mg/L).

Concentrația BB FCF cu efect toxic asupra creșterii algelor (EC₅₀) după incubare 72 h a fost de 24 mg/L. Efecte semnificative au fost observate și la concentrații ale BB FCF de 50 mg/L respectiv 100 mg/L.

În figura 6.19 sunt prezentate rezultatele efectelor de toxicitate acută a soluțiilor ozonizate asupra dafniilor. Tratamentul cu ozon coroborat cu acidifierea probelor a crescut randamentul decolorării dar a dus la creșterea toxicității soluțiilor astfel tratate, din cauza înaltei capacități oxidante a ozonului, care conduce la compuși secundari mai toxici decât cei inițiali [152].

Probele ozonizate au exercitat de 5-10 ori mai multă toxicitate decât eşantioanele netratate.

Acelasi nivel al toxicității a fost observat și în cazul probelor ozonizate la care s-a aplicat corecție de pH.

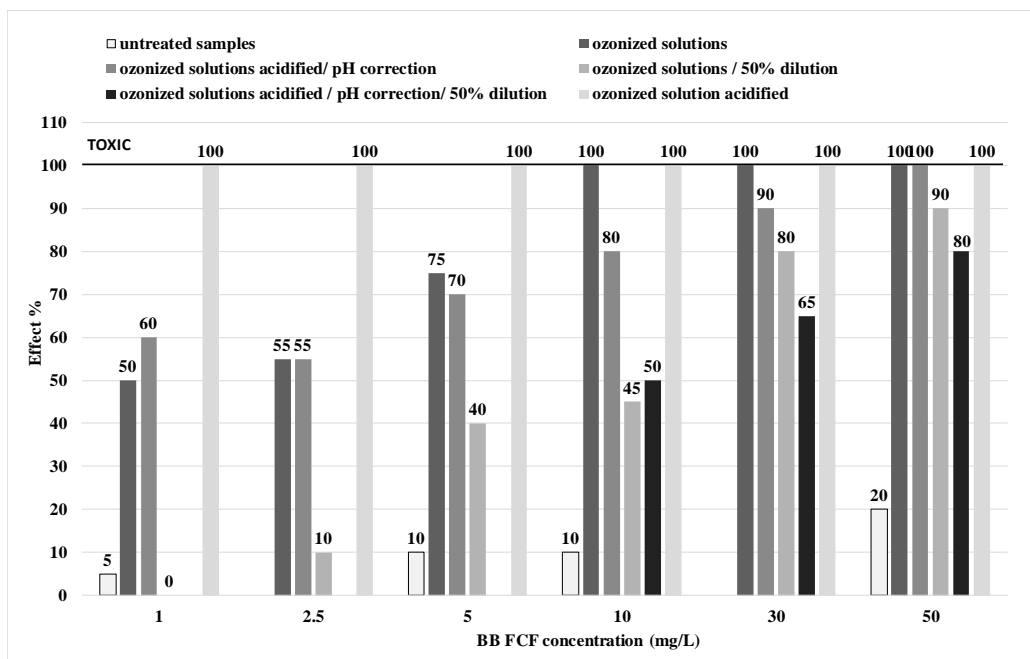


Fig. 6.19: Toxicitatea acuta a solutiilor de BB FCF ozonizate asupra crustaceelor planctonice

Toxicitatea probelor ozonizate a scăzut odată cu diluarea acestora în proporție de 50%, dar chiar și în aceste cazuri toxicitatea a fost superioară soluțiilor BB FCF netratate, având concentrații de 5, 10, 30 și 50 mg/L.

Aceeași tendință a toxicității a fost observată în cazul soluțiilor ozonizate și acidificate, cu corecție de pH și diluate 50%.

Acidifierea soluțiilor ozonizate (pH=4) a produs o decolorare mai eficientă dar cu prețul unei toxicități mari (100%), incompatibile cu supraviețuirea speciilor studiate, ceea ce a impus corectarea pH-ului la 6.5 – 8.5.

Soluțiile de BB FCF ozonizate diluate 50% au avut efecte între 0 și 100% pe dafnii, nivelul toxicității fiind mai mic decât al eșantioanelor nediluate. La un EC50(48h) calculat pentru un eșantion diluat 50% valoarea toxică a fost de 4.8 mg/L BB FCF (fig. 6.20). Această valoare indică faptul că soluțiile de BB FCF ozonizate în vederea decolorării determină efecte foarte toxice (50-100%).

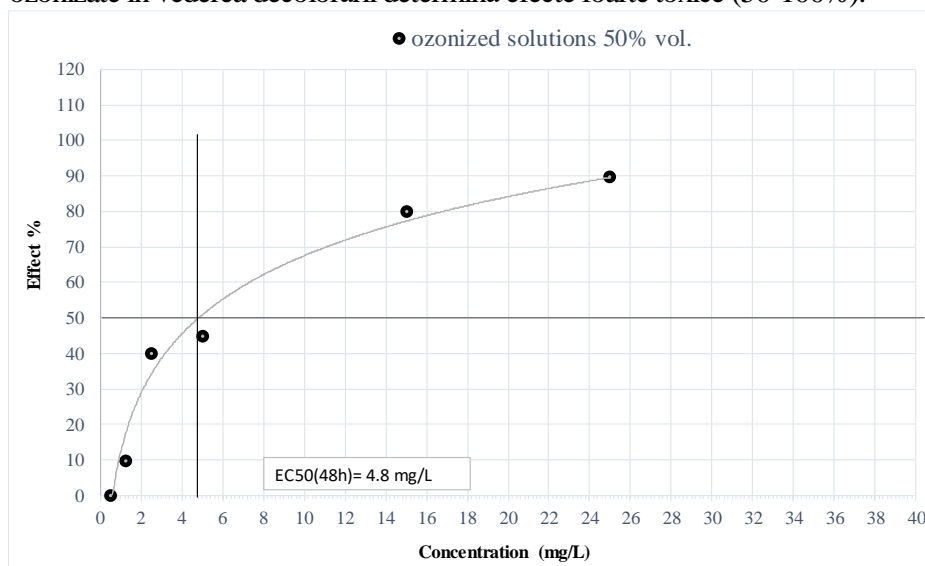


Fig. 6.20: Estimarea EC50 (48h) pentru soluțiile de BB FCF diluate 50%

Studii precedente au arătat un randament al decolorării de peste 90% în cazul unor soluții de BB FCF de 5 mg/L respectiv 10 mg/L ozonizate (200mg O₃/L), în condiții de agitare (200 rpm) și acidificate

(pH4) [145,147], dar impactul toxic asupra organismelor a fost semnificativ (80%). Diluarea acestor soluții cu 50% a scăzut efectele toxice la 45 – 50%.

Putem trage astfel concluzia că toxicitatea eșantioanelor ozonizate (mai ales a celor cu concentrație ≤ 10 mg/L) poate fi micșorată prin diluarea acestora cu $>50\%$, la un pH de 6.5 – 8.5 potrivit pentru supraviețuire. Utilizarea unor concentrații și mai mici de BB FCF (2.5 sau 5 mg/L) ozonizate și apoi diluate va asigura o toxicitate mult scăzută (10 – 40%).

Luând în considerare concentrațiile non-toxice prevăzute pentru BB FCF (PEC) pentru apele de suprafață ($< 0.1 - 626$ $\mu\text{g/L}$), în conformitate cu sectorul economic (industrial, alimentație, cosmetic) [307], nivelul estimat al toxicității poate fi redus de aprox 100 de ori.

Capitolul 7. Concluzii

Obiectivele generale și specifice asumate în cadrul lucrării de doctorat au fost realizate printr-un amplu studiu bibliografic, prin efectuarea a două studii clinice și prin desfășurarea unui complex studiu de mediu.

Studiul clinic comparativ privind aplicarea O_3T în diabetul zaharat complicat cu neuropatie diabetica (capitolul 4) a fost efectuat în scopul de a evalua și cuantifica efectul O_3T , aplicată complementar la 73 pacienți suferind de diabet zaharat (DZ) complicat cu neuropatie diabetica (ND), patologie constituind o gravă problemă de sănătate publică, prin creșterea alarmantă a numărului de cazuri, dezvoltarea complicațiilor cronice (de ex: piciorul diabetic, cu evoluție nefastă spre amputații) și prin agravarea co-morbidităților (cardiovasculare etc). După 5 săptămâni de O_3T a fost constatată ameliorarea semnificativă a majorității parametrilor clinici și biologici monitorizați (biochimici, metabolici, ai suferinței neuropate și ai calității vieții). Prelucrarea statistică a datelor obținute a permis corelații complexe între parametrii biologici și cei clinici, între vârsta înaintată și evoluția prelungită a bolii etc.

În cadrul studiului privind aplicarea O_3T în nevralgia de trigemen (capitolul 5) a fost urmărit efectul ozonoterapiei (O_3T) asupra unui grup de 33 pacienți suferind de nevralgie trigeminală (NT), o afecțiune dureroasă debilitantă, foarte dificil de tratat. Pacienților li s-au aplicat 12 -15 ședințe de tratament cu o frecvență de 2-3 ședințe/săptămână.

Pacienții au fost considerați respondenți pe baza ameliorării/dispariției durerii, a satisfacției generale, a reluării activităților obișnuite etc. Au fost luate în considerare modificările cantitative și calitative ale durerii și ale simptomelor/semnelor asociate.

Pacienții au fost pe deplin informați cu privire la scopul/procedura tratamentului și toți au semnat un consimțământ informat. Studiile au fost aprobate de Comitetul de Etică al Centrului Medical.

Concluzii ale studiilor medicale - Efectele benefice ale O_3T prezentate în cele două studii medicale s-au datorat acțiunii sale multimodale: de restabilire a homeostaziei redox, de imunomodulare, de combatere a neuroinflamației, a apoptozei/senescenței celulare, afectării endoteliale și îmbunătățire a oxigenării tisulare, de re-echilibrare a metabolismului energetic, glucidic și lipidic, de implicare în mecanismul nocicepției. De asemenea a influențat pozitiv statusul psiho-emoțional (reducând anxietatea/depresia).

Utilizarea concentrațiilor mici de ozon (5 – 35 $\mu\text{g O}_3/\text{mL}$) a condus la acțiune hormetică asupra substratului biologic, fără efecte toxice. Efectele secundare ale O_3T sunt minime: Federația Mondială de Ozonoterapie (WFOT) estimează incidența complicațiilor la 0,0007% [77]. În studiile prezentate O_3T a acționat indiferent de vechimea bolii - recentă sau cu evoluție îndelungată și în ciuda factorilor agravanti (vârsta pacienților, comorbidități etc.). Aceste concluzii sunt în acord cu vasta literatură dezvoltată în ultimii 30-40 de ani privind terapia cu ozon [49,50,81,87,92,94,98,103,105,106,214-216,245,272].

Având în vedere potențialul oxidativ al ozonului (inclusiv al celui medical) acest tratament trebuie să îndeplinească anumite criterii cumulative: să fie aplicat de către medici

bine pregătiți, în doze mici, spațiate și în cazuri atent selectate; concentrațiile de O₃ trebuie adaptate în funcție de patologia existentă și de starea pacientului – în special luând în considerare gravitatea distresului oxidativ și eficiența apărării antioxidante a pacientului. Empirismul în O₃T poate ridica preocupări fundamentale în ceea ce privește eficacitatea și siguranța acestui tratament [132]. Dacă ozonoterapia este aplicată corect – diagnostic precis, doze adecvate, proceduri standard, asociat la tratamentul/dieta recomandate – va acționa favorabil asupra bolii, îmbunătățind starea clinică, stimulând procesul de vindecare, practic fără efecte secundare [272]. Ozonul medical reprezintă o terapie complementară sigură și eficientă, dar sunt necesare cercetări suplimentare pentru a confirma eficacitatea și limitele acestui tratament.

Elemente de originalitate a studiilor medicale:

- Modalitatea complexă de evaluare a pacienților înainte și după O₃T;
- Utilizarea de teste simple, ușor reproductibile „la patul bolnavului” (sQST) pentru tulburările de sensibilitate, permițând conturarea unui fenotip senzorial caracteristic al pacienților selectați, util pentru precizarea substratului anatomic și pentru predictibilitatea răspunsului la tratament. Se pare că această lucrare este **primul studiu privind O₃T aplicată în nevralgia trigeminală (NT) care utilizează aceste teste;**
- Prezentarea comparativă a mecanismelor etiopatogenice implicate în NT și efectul multifactorial al ozonului medical (Tabelul 5.22);
- Asocierea tipurilor de aplicație a ozonului medical: aplicații topice, locale și loco-regionale și CDL, combinate cu aplicațiile generale – care pare a fi cea mai eficientă strategie terapeutică, acționând sinergic și cumulând beneficiile efectelor locale și generale ale ozonului;
- Aplicarea particulară a ozonului medical- prin injecții subcutanate efectuate nu doar în zona dureroasă, ci și simetric în alte puncte cefalice și cervico-dorso-lombare; aceste aplicații loco-regionale au acționat asupra: homeostaziei oxidative locale, substratului inflamator și hipoxic, sensibilizării periferice, modulării nociceptive, regenerării țesutului nervos;
- Descrierea fenotipurilor senzoriale la pacienții studiului – existența acestor fenotipuri a permis precizarea substratului anatomic al suferinței neuropate și a explicat, în mare parte, variabilitatea răspunsului la tratament.

Perspective de cercetare - Sunt necesare studii aprofundate pentru a demonstra acțiunile și limitările O₃T:

- studii multicentrice naționale/internaționale cu criterii de diagnostic și selecție bine precizate și proceduri unitare. Ideal – studii randomizate, controlate, cu dimensiuni mari ale eșantionului de pacienți, eventual cu aplicare în simplu-dublu-orb și cu perioade de urmărire post-studiu mai îndelungate;
- sunt necesare metode de profilare senzorială valide, fiabile și scalabile;
- sunt recomandate analize specifice de laborator și imagistică;
- aprofundarea studiilor privind interacțiunea O₃ medical;
- studii de O₃T și în alte patologii prezentând ca patogene SO, inflamația cronică, durerea cronică, senescența precoce etc.

În capitolul 6 („Cercetări privind decolorarea prin ozonizare a mediilor apoase”) au fost urmărite:

Aplicabilitatea procesului de ozonizare la decolorarea unor coloranți refractari la metode de tratare convenționale. A fost selectat Albastru Brilliant (BB), un colorant sintetic folosit uzual în industria farmaceutică, alimentară, textilă, cosmetică, și chiar în medicină;

- Studiarea factorilor de influență: pH, concentrația inițială a colorantului și a ozonului aplicat, timpul de contact, raportul molar [O₃:BB], timpul de agitare, în vederea stabilirii

parametrilor optimi de decolorare pentru obținerea unui efluent cu indicatori de calitate conform legislației în vigoare;

- Studiarea decolorării prin ozonizare la pH neutru;
- Eliminarea culorii prin ozonizare nu conduce la o mineralizare completă a colorantului, așadar a fost efectuată identificarea produșilor intermediari de oxidare, obținuți la degradarea BB prin ozonizare, în condițiile date, prin spectroscopie $^1\text{H} - \text{NMR}$;
- Studiarea comparativă a ecotoxicității colorantului BB și a soluțiilor după ozonizare - prin urmărirea efectelor asupra unor organisme acvatică - a relevat faptul ca produșii intermediari formați au prezentat o toxicitate mai mare decât a colorantului inițial;
- Abordarea dinamicii procesului prin verificarea modelelor cinetice clasice nu a condus la rezultate interpretabile, necunoscându-se stoichiometria reacțiilor în timpul ozonizării, astfel încât a fost propus un model cinetic complex pentru decolorarea cu ozon a soluțiilor de BB - model bazat pe informațiile oferite prin analiza spectrului de masă a colorantului, coroborate cu date oferite de studiul toxicității produșilor și ținând cont de succesiunea de reacții posibile și a multiplelor posibilități de scindare a colorantului;
- Rezultatele obținute în cercetarea efectuată au permis o evaluare corectă a avantajelor și dezavantajelor acțiunii ozonului asupra acestui colorant.

Concluziile studiului “Date preliminare privind comportamentul ozonului în soluții apoase” (capitolul 6.3) – Ozonizarea soluțiilor apoase de colorant BB FCF fără modificare de pH a condus, în anumite condiții de reacție, la decolorarea rapidă și eficientă a acestuia. Procesele de oxidare (doar prin ozonizare sau în cadrul AOP) se dovedesc a fi alternative promițătoare pentru îndepărtarea acestui colorant, conducând la decolorări de peste 90% în anumite condiții fizico-chimice. Eficiența decolorării a fost maximă în cazul concentrațiilor mici de colorant (10 mg/L), la care s-au aplicat concentrații de ozon (200 mg O_3 / L a. g.), în condiții de agitare mecanică (200 rot / min), la o valoare de pH = 7,03.

Rezultatele cercetării au mai subliniat și influența purității ozonului asupra procesului de oxidare, ozonul fiind obținut din oxigen de puritate 99,5%.

Rezultatele acestui studiu preliminar s-au constituit ca premise ale cercetărilor ulterioare, privind mecanismele și eficiența ozonizării în medii acide, respectiv alcaline, la cinetica reacțiilor. De asemenea datele au fost utile pentru identificarea produșilor secundari și la evaluarea toxicității acestora.

Concluziile studiului privind influența pH-ului asupra decolorării sistemelor apoase prin ozonizare (capitolul 6.4) - Rezultatele experimentale au arătat că atât pH-ul soluțiilor apoase cât și concentrația de ozon au favorizat eficiența decolorării. În funcție de acești doi factori importanți s-au putut stabili și timpii de contactare colorant - ozon. Valorile pH-ului de 4,0; 7,0 și 10,0 au favorizat decolorarea BB FCF. Acest lucru s-a datorat efectelor predominante ale ozonului molecular, la pH acid, și efectele radicalilor hidroxil, la pH alcalin. La pH neutru se presupune un efect echilibrat al ozonului molecular și al radicalilor hidroxil.

Din interpretarea rezultatelor experimentale se pot trage următoarele concluzii:

- La pH = 4 randamentele de decolorare sunt mai mici față de cele de la pH = 10, la aceiași timp de contact;
- La pH=10, eficiența decolorării fiind mai bună, aceasta se produce într-un timp de contactare colorant - ozon, mai scurt (60 s față de 90 s la pH = 4);
- La pH=7, eficiența decolorării este scăzută (între %R = 49,2 și %R = 99,6) la varianta fără agitare și (între %R = 66,1 și %R > 99,9) la varianta cu agitare, probabil printr-un efect de echilibru între cele două specii predominante de la pH acid și

alcalin. Acesta a fost și motivul unui timp de contactare mai lung, ajungând până la 900 s;

- În condiții de agitare mecanică (200 rot / min) randamentele de decolorare au avut valori mai mari (între %R = 66,1 și %R >99,9) față de varianta fără agitare (între %R = 49,2 și %R >99,9).

Concluziile studiului privind aspecte ale cineticii procesului de decolorare a BB FCF cu ozon (capitolul 6.5) - Rezultatele obținute în acest capitol al tezei de doctorat au permis să se facă următoarele evaluări pentru procesul de decolorare a BB FCF prin ozonizare:

- Procesul de ozonizare a colorantului BB poate produce mai mulți compuși ca rezultat al oxidării, în funcție de condițiile inițiale de reacție, datorită complexității structurale a substratului;
- Modelele cinetice clasice nu sunt aplicabile, deoarece produșii de oxidare inițiali pot fi ulterior ozonizați, astfel încât procesul real implică o succesiune de reacții în lanț;
- Analiza spectroscopiei ¹H-RMN a fost efectuată la momentul decolorării. Rezultatele arată clar că decolorarea nu indică o mineralizare completă. În consecință, procesul trebuie continuat, după decolorarea inițială, pentru a se evita rămânerea în sistem a unor produși secundari noi, incolori, dar toxici;
- Decolorarea BB FCF are loc prin reacții succesive care oferă o posibilitate de modelare a procesului luând în considerare atât difuzia ozonului din gaz în lichid cât și sistemul de reacție în lanț, în faza lichidă.

Concluziile studiului privind toxicitatea colorantului BB FCF și ai produșilor de oxidare (capitolul 6.6) - Acest subcapitol a prezentat un studiu comparativ al ecotoxicității soluțiilor de BB FCF înainte și după ozonizare. Ozonul a fost foarte eficient în decolorarea soluțiilor, totuși nu suficient de puternic pentru a asigura mineralizarea completă a colorantului, mai mult decât atât conducând la produși de oxidare toxici.

Pentru studiul asupra ecotoxicității s-au utilizat trei specii de organisme acvatice (*Daphnia magna*, *Cyprinus carpio*, *Selenastrum capricornutum*).

Testele de toxicitate acută ale soluțiilor apoase de BB FCF au demonstrat lipsa toxicității asupra peștilor și dafniilor (LC/EC₅₀>100 mg/L), dar și influența negativă asupra procesului de creștere a algelor verzi (EC_{r50}=24 mg/L).

Pe baza rezultatelor experimentale colorantul a fost inclus în Categoria a 3-a de toxicitate acută.

Soluțiile tratate cu ozon în concentrație de 200 mg O₃/L au manifestat efecte toxice semnificative asupra *Daphnia magna*, foarte probabil prin apariția unor produși de oxidare conținând grupări care provoacă toxicitate. Acești compuși au fost identificați și descriși în Cap. 6.5.2, pag. 147.

Randamentul decolorării după ozonizare la aceste concentrații a fost ridicat (90%), însă impactul toxic asupra organismelor nu poate fi neglijat.

Așadar, produșii de reacție rezultați în urma ozonizării soluțiilor apoase de BB FCF manifestă toxicitate acvatică acută mult mai mare decât colorantul în soluții de până la 100 mg/L, ceea ce impune alte tratări suplimentare în cazul soluțiilor postozonizate, cum ar fi: corecții de pH, diluții cu apă în proporții diferite (50 – 60 %), cu utilizarea unor concentrații mai mici de BB FCF (≤10mg/L).

Perspective de studii privind alte aplicații ale O₃ în mediu – înlăturarea prin ozonizare a micropoluantilor (hormoni estrogenici, AINS, metotrexat etc.) din soluții apoase /ape reziduale.

Bibliografie selectivă

29. ***Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) Ozone FT n0 43 June 2024

49. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. *Diabetes Metab Syndr*. 2011 Jan-Mar;5(1):45-9, 2011
50. Fathi A.M., Mawsouf M.N., & Viebahn-Hänsler R. “Ozone Therapy in Diabetic Foot and Chronic, Nonhealing Wounds”. Journal: *Ozone: Science & Engineering*, Volume 34, Issue 6, November 2012, pages 438-450, 2012
81. Viebahn-Haensler R, León Fernández OS. Mitochondrial Dysfunction, Its Oxidative Stress-Induced Pathologies and Redox Bioregulation through Low-Dose Medical Ozone: A Systematic Review. *Molecules*. 2024 Jun 8;29(12):2738, 2024
87. Viebahn R, Leon O. In “Ozone in Medicine. From Science to Guidelines and Treatment Concepts”. *ODREI publisher Dr.J.Hansler GmbH*, 2020
92. Hidalgo-Tallon F.J., Torres-Morera L. M, Baesa-Noci J., Carillo-Izquierdo M.D., Pinto-Bonilla R. Updated Review on Ozone Therapy in Pain Medicine. *Front Physiol*. 2022; 13: 840623, 2022
94. Re L., Martínez-Sánchez G., Bordicchia M., Malcangi G., Pocognoli, Morales-Segura M.A., Rothchild J., Rojas A. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol*, 2014 Nov 5:742:158-62, 2014
98. Viebahn-Haensler R., León Fernández O.S. Ozone as Redox Bioregulator in Preventive Medicine: The Molecular and Pharmacological Basis of the Low-Dose Ozone Concept—A Review. *Int. J. Molecular Sciences*. 2023; 24(21):15747, 2023
103. Menendez-Cepero S., Leon O.S., Martinez G. and Alvarez H. Ozone Therapy in diabetes and its complications. Proceedings of the 5Th WFOT Meeting; 2016 Nov 18 20; Mumbai, India. *J Ozone Ther*. 2018;2(2), 2018
105. Martínez-Sánchez G., Al-Dalain S.M., Menéndez S., Re L., Giuliani A., Candelario-Jalil E., Alvarez H., Fernández-Montequín J.I., León O.S. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005 Oct 31;523(1-3):151-61, 2005
106. Kushmakov R., Gandhi .J, Seyam O., et al. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res*. 2018;8(3):111–115. 2018
145. **Marcvart M.**, Constantin C., Stoica L. Discoloration of Food Dyes from Aqueous Media by Ozonation. Case Study: Brilliant Blue. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 81, Iss. 3, 2019
147. Vaiano V., G. Iervolino, L. Rizzo, D. Sannino - Advanced Oxidation Processes for the Removal of Food Dyes in Wastewater. *Current Organic Chemistry*, 21, 12, 1068-1073(6), 2017
148. da Silva J.C., Bispo G.L., Pavanelli S.P., de Cássia R.J., Afonso F., Augusti R. Ozonation of the food dye Brilliant Blue in aqueous medium: monitoring and 185 characterization of products by direct infusion electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Wiley Online Library, Rapid Commun. Mass Spectrom*. 26, 1305–1310, 2012
152. Davidson J, Good C., Welsh C., Summerfelt S. - The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water recirculating systems. *Aquacultural Engineering* 44, 80-96, 2011
191. Chirila V., Radulian G. – Capit. 8. Piciorul diabetic- Ghid de management al diabetului zaharat. Capit. 8. *SRDNM si FRDNBM*, 2021
196. Wagner F.W. Jr. The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot Ankle* 1981;2(2):64–122, 1981
197. Monteiro-Soares M., Boyko E.J., Jeffcoate W., Mills J.L., Russell D., Morbach S., Game F. Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Wiley’ Journal of Diabetes Research*, March 2020
200. Apelqvist J, Bakker K, van Houtum WH, Nabuurs-Franssen MH, Schaper NC. International consensus and practical guidelines on the management and the prevention of the diabetic foot. International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000 Sep-Oct;16 Suppl 1: S84-92, 2000
201. Feldman E.L. and Stevens M.J. Clinical Testing in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Can. J. Neurol. Sci*. 1994; 21: Suppl. 4-S3-S7, 1994
202. Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve*. 1988 Jan;11(1):21-32, 1988

203. Catrinoiu D. Ghid de management al diabetului zaharat. Capitolul 3 Evaluarea pacientului cu diabet zaharat tip 2. Elaborat de SRDNM si FRDNBM, 2021
204. Burrow J.G., Romr K., Padhiar N. Examination and Diagnosis in Clinical Management. Neale's Disorders of the Foot and Ankle (Ninth Edition), 2020
205. Gescheider G A. Psychophysics -The Fundamentals. Psychology Press.2013
206. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 1994 Nov;17(11):1281-9, 1994
207. Maier C, Baron R, Tölle T, Binder A, Birbaumer N, Birklein F, Gierthmühlen J, Flor H, Geber C, Hüge V, Krumova E K, Landwehrmeyer G B, Magerl W, Maihöfner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Schwarz A, Sommer C, Tronnier V, Üçeyler N, Valet M, Wasner G, Treede D.R. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain*. 2010 Sep;150(3):439-450, 2010
214. Clavo B, Borrelli E. Editorial: Ozone in medicine: Biochemical background, physiological modulation and clinical applications. *Front Physiol*. 2023 Feb 6;14: 111286, 2023
215. Clavo B, Cánovas-Molina A, Díaz-Garrido JA, Cañas S, Ramallo-Fariña Y, Laffite H, Federico M, Rodríguez-Abreu D, Galván S, García-Lourve C, González-Beltrán D, Caramés MA, Hernández-Fleta JL, Serrano-Aguilar P, Rodríguez-Esparragón F. Effects of ozone therapy on anxiety and depression in patients with refractory symptoms of severe diseases: a pilot study. *Front Psychol*. 2023 Aug 4;14: 1176204, 2023
216. Clavo B., Santana-Rodriguez N., Gutierrez D., Lopez J.C., Suarez G., Lopez L., Robaina F., Bocci V., Ganesh Yerra V., Negi G., Sharma S.S., Kumar A. - Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF-κB pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biol*. 2013; 1:394–397, 2013
235. ***Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version), Cephalalgia 2013, 33(9):629-808, 2013
245. Zhuang Z.G., Lu L.J., Peng B.G., Ma K., Cai Z.Y., Fu Z.J., Liu G.Z., Liu J.F., Liu W.T., Li X.H., Song T., Wu D.S., Yao J., Yao P., Yu J.S., Liu Y.Q. Expert consensus of Chinese Association for the Study of Pain on the application of ozone therapy in pain medicine. *World J Clin Cases*. 2021 Mar 26;9(9):2037-2046, 2021
272. **Marcvart M.**, Tiron S., Alassadi A., Stoica L. Dual Behavior of Ozone – Environmental and Health Implications. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 20, No 2, 976–985, 2019
277. Chebotarev A.N., Bevziuk K.V., Snigur D.V., Bazelb Ya.R. The Brilliant Blue FCF Ion molecular forms in Solutions according to the Spectrophotometry Data. *Russian Journal of Physical Chemistry A* 91(10) 1907-1912, 2017
282. Z.A. Ayoub, O.A.Yazbeck, M.M. El Jamal - Kinetic Study of Acid Blue 1 Discoloration with Persulfate - *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52, 5, 812-824, 2017
291. Liu B.W., Chou M.S., Kao C.M., Huang B.J. Evaluation of Selected Operational Parameteres for Decolorization of Dye-finishing Wastewater using UV/Ozone. *Ozone: Science&Engeneering The Journal of the International Ozone Association*. 26(3), 2004
292. Chen T.Y., Kao C.M., Hong A., Lin C.E., Liang S.H. Application of Ozone on the Decolorization of reactive Dyes- Orange-13 and Blue-19. *Desalination* 249, 1238-1242, 2009
294. Chu, W.; Ma, C.W. Quantitative Prediction of Direct and Indirect Dye Ozonation Kinetics. *Water Res*. 2000, 34, 3153–3160, 2000
296. Tarek, M.E. Chapter Four—Ozonation in drinking water treatment: An overview of general and practical aspects, mechanisms, kinetics, and byproduct formation. *Compr. Anal. Chem*. 2021, 92, 85–116 2021
297. Crisciu AV, Stoica L, Constantin C, **Marcvart M**, Hanganu A, Ianos MG. Kinetic Modeling of Brilliant Blue Discoloration by Ozonation. *Sustainability*. 2024; 16(21):9591, 2024
300. **Marcvart-Tiron M.**, Lucaciu I.E., Nita-Lazar M., Gheorghe S. Considerations on the Toxicity of Brilliant Blue FCF Aqueous Solutions before and after ozonation. *Rev. Chim*, 71/5, 356-365, 2020

305. ***Commission Regulation (EU) no 286/2011 of 10 March 2011 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures
306. ***<https://cfpub.epa.gov/ecotox> (accessed on 04.12.2019)
307. ***<https://www.canada.ca/content/dam/eccc/documents/pdf/pded/triarylmethanes/Draft-screening-assessment-triarylmethanes-group.pdf>, Draft Screening Assessment Triarylmethanes Group, Environment and Climate Change Canada Health Canada, December 2018 (accessed on 04.12.2019)